


TJ/223

**IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE
GENES DE LA BIOSINTESIS DE
CAROTENOIDES EN LA CIANOBACTERIA
Synechocystis sp. PCC 6803.**

Trabajo presentado para optar al grado
de Doctor en Biología por la licenciada
Blanca María Fernández González



Sevilla, Enero de 1998.

Director:



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

INDICE

INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XIII
1. INTRODUCCION	1
1.1. LOS CAROTENOIDES	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Biosíntesis de los carotenoides	4
1.1.2.1. <i>Ruta de síntesis de carotenoides</i>	4
1.1.2.2. <i>Biología molecular de la síntesis de carotenoides</i>	9
1.1.2.3. <i>Regulación de la síntesis de carotenoides</i>	11
1.2. LAS CIANOBACTERIAS	13
1.2.1. Características generales	13
1.2.2. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	15
1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	17
2. MATERIALES Y METODOS	19
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	21
2.1.1. Cianobacterias	21
2.1.1.1. <i>Estirpes de cianobacterias utilizadas</i>	21
2.1.1.2. <i>Cultivos de cianobacterias en medio líquido</i>	21
2.1.1.3. <i>Cultivos de cianobacterias en medio sólido</i>	22
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	23
2.1.2.1. <i>Estirpes utilizadas</i>	23
2.1.2.2. <i>Cultivo de E.coli en medio líquido</i>	23
2.1.2.3. <i>Cultivo de E.coli en medio sólido</i>	25

2.2. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES	25
2.2.1. Preparación de extractos de <i>Synechocystis</i>	25
2.2.2. Preparación de extractos de <i>E. coli</i>	25
2.3. DETERMINACION DE LA INHIBICION <i>IN VIVO</i> DE LA SINTESIS <u>DE CAROTENOIDES</u>	26
2.4. ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	26
2.4.1. Actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)	26
2.4.2. Actividad β -caroteno cetolasa	27
2.4.3. Actividad ζ -caroteno desaturasa	27
2.5. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR	28
2.5.1. Plásmidos y genotecas utilizados	28
2.5.2. Métodos de transformación genética	30
2.5.2.1. Transformación de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	30
2.5.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	30
2.5.3. Infección de <i>E. coli</i> con fagos	31
2.5.4. Escisión <i>in vivo</i> de plásmidos del vector lambda ZAP	32
2.5.5. Aislamiento y análisis de DNA	32
2.5.5.1. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala	32
2.5.5.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	33
2.5.5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	33
2.5.5.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	34
2.5.5.5. Determinación de la concentración de DNA en solución	34
2.5.6. Aislamiento y análisis de RNA	35
2.5.6.1. Aislamiento de RNA total de <i>Synechocystis</i>	35
2.5.6.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa	36
2.5.6.3. Determinación de la concentración de RNA en solución	36
2.5.7. Tratamiento enzimático de DNA	37
2.5.7.1. Restricción de DNA	37
2.5.7.2. Relleno de extremos protuberantes	37
2.5.7.3. Ligación	37
2.5.7.4. Marcaje radiactivo de sondas de DNA	38

2.5.8. Técnicas de hibridación	38
<i>2.5.8.1. Transferencia de DNA de gel de agarosa a membranas de nylon</i>	38
<i>2.5.8.2. Transferencia de DNA de fagos a filtros de nitrocelulosa</i>	39
<i>2.5.8.3. Transferencia de DNA de colonias a membranas de nitrocelulosa</i>	39
<i>2.5.8.4. Transferencia de RNA a membranas de nylon</i>	40
<i>2.5.8.5. Hibridación de fragmentos de DNA en condiciones restrictivas</i>	40
<i>2.5.8.6. Hibridación in situ de placas de fagos e hibridación de colonias</i>	41
<i>2.5.8.7. Hibridación de fragmentos de RNA</i>	42
2.5.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
2.5.10. Secuenciación de DNA	45
<i>2.5.10.1. Obtención de deleciones seriadas mediante tratamiento con exonucleasa III</i>	45
<i>2.5.10.2. Desnaturalización del DNA</i>	45
<i>2.5.10.3. Reacciones de secuenciación</i>	46
<i>2.5.10.4. Resolución de secuencias de DNA en geles de poliacrilamida</i>	46
2.5.11. Reacciones de extensión del cebador	47
<i>2.5.11.1. Marcaje de los oligonucleótidos en el extremo 5'</i>	47
<i>2.5.11.2. Hibridación del oligonucleótido con el molde de RNA</i>	48
<i>2.5.11.3. Copia del RNA por la transcriptasa reversa</i>	48
<i>2.5.11.4. Análisis de los productos de la reacción en gel de poliacrilamida</i>	48
 2.6. METODOS ANALITICOS	 49
2.6.1. Electroforesis de proteínas	49
2.6.2. Determinación de carotenoides totales	50
2.6.3. Separación y análisis de carotenoides por HPLC	50
2.6.4. Determinación de clorofila	51
2.6.5. Determinación de proteína	51
2.6.6. Medida de pH	51
2.6.7. Medidas espectrofotométricas	52
2.6.8. Medida de la intensidad de iluminación	52
2.6.9. Determinación de oxígeno en solución	52
 2.7. ANALISIS DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEINA POR METODOS INFORMATICOS	 52

3. RESULTADOS	55
3.1. AISLAMIENTO DE UNA MUTACION DE RESISTENCIA A NICOTINA Y MPTA EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	57
3.1.1. Clonación de la mutacion de resistencia a MPTA y nicotina de MPTA1	57
3.1.2. Localización de la mutación dentro del clon pBF100	59
3.1.3. Clonación y secuenciación de la región de DNA silvestre en la que se localiza la mutación de resistencia a nicotina	61
3.1.3.1. <i>Clonación de la región silvestre</i>	61
3.1.3.2. <i>Secuenciación de la región silvestre</i>	61
3.2. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE ORF B	65
3.3. IDENTIFICACION DE LA MUTACION DE MPTA1	65
3.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE MPTA1	66
3.5. ESTUDIO DE LA ORF sll0147 (ORF B) DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	67
3.5.1. Localización de la región promotora de sll0147 (ORF B)	67
3.5.2. Estudio de la función de sll0147 (ORF B)	68
3.5.2.1. <i>Expresión de sll0147 (ORF B) bajo el control del promotor trc de E. coli</i>	68
3.5.2.2. <i>Inactivación de ORF B en <i>Synechocystis</i></i>	70
3.6. CLONACION DE <i>crtB</i>	71
3.6.1. Aislamiento de clones solapantes con el inserto de pAV12	72
3.6.2. Mapa de restricción de los clones pBF1-pBF4	75
3.6.3. Inserción de <i>npt</i> en varias posiciones de la región clonada	76
3.6.3.1. <i>Construcción de plásmidos portadores de <i>npt</i></i>	76
3.6.3.2. <i>Mutagénesis de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</i>	78
3.6.3.3. <i>Localización del gen <i>crtB</i></i>	79
3.7. LOCALIZACION DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES <i>crtP</i> Y <i>crtB</i> DE <i>Synechocystis</i>	79

3.8. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS GENES <i>crtP</i> Y <i>crtB</i> DE <i>Synechocystis</i>	81
3.8.1. Influencia de la intensidad de luz sobre la expresión del gen <i>crtP</i> de <i>Synechocystis</i>	82
3.8.1.1. <i>Análisis de los mRNA de <i>crtP</i> en distintas condiciones de iluminación</i>	82
3.8.1.2. <i>Obtención de las estirpes FG502 y KWCAT de <i>Synechocystis</i></i>	84
3.8.1.3. <i>Estudio de la actividad CAT de FG502 y KWCAT en distintas condiciones de iluminación</i>	86
3.8.2. Influencia de la intensidad de luz sobre la expresión del gen <i>crtB</i> de <i>Synechocystis</i>	87
3.8.2.1. <i>Estudio de los transcritos del gen <i>crtB</i> en distintas condiciones de iluminación</i>	87
3.8.2.2. <i>Obtención de las estirpes FG602, FG603 y FG605</i>	89
3.8.2.3. <i>Expresión del gen <i>cat</i> en distintas condiciones de iluminación en la estirpe FG603</i>	92
3.8.2.4. <i>Comparación de las secuencias promotoras de <i>crtP</i> y <i>crtB</i></i>	93
3.9. CLONACION DE LAS FASES DE LECTURA ABIERTA slr0088, sll0033 Y slr0940 DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	94
3.10. ESTUDIO DE LA FASE DE LECTURA ABIERTA slr0088	95
3.10.1. <i>Expresión de la ORF slr0088 en <i>E. coli</i></i>	95
3.10.2. <i>Inactivación de <i>crtO</i> en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</i>	98
3.10.3. <i>Análisis de la secuencia de <i>crtO</i></i>	101
3.11. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA β-CAROTENO CETOLASA DE <i>Synechocystis</i>	102
3.12. CARACTERIZACION DEL MUTANTE <i>crtO</i>⁻	104
3.12.1. Efecto de la intensidad de luz	104
3.12.1.1. <i>Efecto de la intensidad de luz sobre el crecimiento y la actividad fotosintética</i>	104
3.12.1.2. <i>Efecto de la intensidad de luz sobre el contenido en carotenoides</i>	105
3.12.2. Efecto de la luz ultravioleta	107

3.13. ANALISIS DE LA ORF sll0033	108
3.13.1. Análisis de la secuencia de sll0033	108
3.13.2. Expresión de sll0033 en <i>E. coli</i>	109
3.13.3. Inactivación de sll0033 en <i>Synechocystis</i>	109
3.14. ESTUDIO DE LA FASE DE LECTURA ABIERTA slr0940	111
3.14.1. Análisis de la secuencia de slr0940	111
3.14.2. Expresión de la ORF slr0940 en <i>E. coli</i>	112
3.15. CARACTERIZACION IN VITRO DE LA ζ-CAROTENO DESATURASA DE <i>Synechocystis</i>	114
4. DISCUSION	117
4.1. MUTACION DE RESISTENCIA A NICOTINA Y MPTA AISLADA EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. ORF sll0147	119
4.2. EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA EXPRESION DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>crtP</i> Y <i>crtB</i> DE <i>Synechocystis</i>	120
4.3. IDENTIFICACION DE LA ORF slr0088 DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 COMO LA CETOLASA DE β-CAROTENO	122
4.4. FUNCION DE LA EQUINENONA EN <i>Synechocystis</i>	124
4.5. IDENTIFICACION DE LA ORF dll0940 COMO LA α-CAROTENO DESATURASA DE <i>Synechocystis</i>	125
4.6. ANALISIS FILOGENETICO DE LOS GENES Y ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES EN CIANOBACTERIAS	125
5. CONCLUSIONES	131
6. BIBLIOGRAFIA	135

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>Synechocystis</i> .	6
Figura 2. Secuencia de desaturación de fitoeno a licopeno.	7
Figura 3. Esquematación del proceso de aislamiento de la mutación de resistencia a nicotina del mutante MPTA1.	58
Figura 4. Mapa de restricción del inserto de DNA del plásmido pBF100.	59
Figura 5. Localización de la mutación de resistencia a nicotina del mutante MPTA1 contenida en el inserto del plásmido pBF100.	60
Figura 6. Estrategia de secuenciación del fragmento de DNA de la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> correspondiente a la zona donde se localiza la mutación de resistencia a nicotina.	62
Figura 7. Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de <i>Synechocystis</i> correspondiente a la fase de lectura abierta ORF B donde se localiza la mutación de resistencia a nicotina y MPTA.	64
Figura 8. Comparación del motivo de unión a nucleótidos con la secuencia de ORF B y de la licopeno ciclasa de <i>Synechococcus</i> 7942	65
Figura 9. Identificación de la mutación de resistencia a nicotina del mutante MPTA 1.	66
Figura 10. Autorradiografía de un gel de secuenciación donde se muestra el inicio de la transcripción de la OFR B de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	68
Figura 11. Esquema de construcción de los plásmidos pBF3000 y pBF1000.	70
Figura 12. Estrategia de inactivación de la ORF sll0147 (ORF B) de <i>Synechocystis</i>	71
Figura 13. Esquema del proceso de aislamiento de clones solapantes con el inserto de pAV12 a partir de la genoteca de <i>Synechocystis</i> en λ -ZAP II.	74
Figura 14. Mapa de restricción de la región de DNA de <i>Synechocystis</i> clonada alrededor del gen <i>crtP</i> .	75
Figura 15. Estrategia de inserción del gen <i>npt</i> en los alrededores de <i>crtP</i> .	77
Figura 16. Autorradiografía de los geles de poliacrilamida en los que se muestra la situación del inicio de la transcripción de los genes <i>crtP</i> y <i>crtB</i> de <i>Synechocystis</i> .	81
Figura 17. Inducción del mRNA del gen <i>crtP</i> por luz.	83

Figura 18. Construcción de las estirpes FG502 y KWCAT de <i>Synechocystis</i> .	85
Figura 19. Actividad CAT de las estirpes FG502 y KWCAT.	87
Figura 20. Inducción del mensajero del gen <i>rtB</i> por luz.	88
Figura 21. Construcción de las estirpes FG602, FG603 y FG605 de <i>Synechocystis</i> .	91
Figura 22. Actividad CAT de las estirpes FG603 y KWCAT.	92
Figura 23. Comparación entre las secuencias próximas al inicio de la transcripción de los genes <i>crtP</i> y <i>crtB</i> .	93
Figura 24. Detección del producto proteico del gen <i>crtO</i> de <i>Synechocystis</i> en extractos crudos de <i>E. coli</i> .	96
Figura 25. Biosíntesis de equinenona en <i>E.coli</i> por el producto del gen <i>crtO</i> .	97
Figura 26. Reacciones catalizadas por los dos tipos de cetolasas de β -caroteno que se han caracterizado.	98
Figura 27. Inactivación del gen <i>crtO</i> .	99
Figura 28. Análisis por HPLC de los carotenoides presentes en la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> 6803 y en la estirpe <i>crtO</i> ⁻ .	100
Figura 29. Esquema de similaridad de la cetolasa de β -caroteno de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con otras proteínas.	102
Figura 30. Espectro de absorción de los productos formados <i>in vitro</i> por el producto del gen <i>crtO</i> a partir de β -caroteno.	103
Figura 31. Curva de crecimiento y desprendimiento de oxígeno de las estirpes silvestre y <i>crtO</i> ⁻ de <i>Synechocystis</i> cultivadas en distintas condiciones de iluminación.	104
Figura 32. Espectros de células enteras de las estirpes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y <i>crtO</i> ⁻ cultivadas en distintas condiciones de iluminación.	106
Figura 33. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida para el gen sll0033 de <i>Synechocystis</i> y para el gen <i>crtQ-1</i> de <i>Anabaena</i> .	109
Figura 34. Inactivación de la ORF sll0033 de <i>Synechocystis</i> .	110
Figura 35. Comparación entre distintas ζ -caroteno desaturasas conocidas y slr0940.	112
Figura 36. Conversión <i>in vitro</i> de ζ -caroteno y neurosporeno por el producto de expresión del gen slr0940.	114

- Figura 37. Comparación entre las desaturasas de carotenoides cianobacterianas (CrtP, CrtQ-1, CrtQ-2 y CrtO) con la desaturasa de fitoeno de tipo bacteria de *Erwinia uredovora* (CrtI) y una de tipo planta de *Lycopersicon esculentum* (Pds).** 126
- Figura 38. Arbol filogenético de las desaturasas de carotenoides y proteínas relacionadas.** 127
-

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Estirpes de <i>E. coli</i> usadas en este trabajo.	23
TABLA 2.	Plásmidos usados en este trabajo	28
TABLA 3.	Valores de I_{50} (mM) para la inhibición <i>in vivo</i> y factores de resistencia del mutante MPTA1 frente a nicotina y MPTA.	67
TABLA 4.	Carotenoides acumulados en <i>E. coli</i> en presencia de pTRC0088 junto con varios plásmidos que contienen genes para la biosíntesis de carotenoides.	96
TABLA 5.	Conversión <i>in vitro</i> de β -caroteno por homogenados de células de <i>E. coli</i> que expresan <i>crtO</i> .	103
TABLA 6.	Contenido en carotenoides (mg carotenoides/g peso seco) de las estirpes silvestre (6803) y <i>crtO</i> ⁻ de <i>Synechocystis</i> cultivadas durante 72 h bajo dos intensidades de luz diferentes.	106
TABLA 7.	Carotenoides que forma <i>E. coli</i> después de la complementación de pTRC0940 con otros plásmidos carotenogénicos.	113

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Ap ^r	Resistencia a ampicilina
bisacrilamida	N, N'-bis-metilén-acrilamida
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CHL, Chl	Clorofila
Ci	Curio
Cm ^r	Resistencia a cloranfenicol
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Deoxiadenín-5'-trifosfato
dCTP	Deoxicitidín-5'- trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Desorirribonucleasa
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitrol
Exo III	Exonucleasa III
FAD	Flavín-adenina dinucleótido oxidado
FPP	Farnesil pirofosfato
FR	Factor de resistencia
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
I ₅₀	Constante de inhibición <i>in vivo</i> de la síntesis de carotenoides
IPP	Isopentenil pirofosfato
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
J852	4-(3-metil-propoxil)-2-isopropilamino-6-metilpiridina
kb	Miles de pares de bases
kDa	kiloDalton
K _i	Constante de inhibición enzimática
Km ^r	Resistencia a kanamicina
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
MOPS	Acido 3-(N-morfilino) propanosulfónico

MPTA	[2-(4-metilfenoxi) trietilamina hidrocioruro]
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
mU	Miliunidades de actividad enzimática
MVA	Acido mevalónico
Na ₂ -EDTA	Sal disódica del ácido etilen-diamino-tetraacético
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fostato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fostato reducido
ORF	Fase de lectura abierta
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de bases
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPPP	Prefitoeno pirofosfato
RNA	Acido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm ^r	Resistencia a estreptomicina
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina
Tet ^r	Resistencia a tetraciclina
Tm	Temperatura de fusión
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
u.f.p.	Unidades formadoras de placas
U.V.	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
μE	Microeinstein

Bases nitrogenadas

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos

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

1. INTRODUCCION

1.1. LOS CAROTENOIDES

1.1.1. Características generales

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) constituyen el grupo de pigmentos más amplio de la Naturaleza habiéndose identificado más de 600 diferentes hasta la fecha. Estos compuestos son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos (Britton, 1988).

En los organismos fotosintéticos los carotenoides son componentes esenciales del aparato fotosintético y se localizan en los centros de reacción de los fotosistemas y en los complejos antena (Goodwin, 1980; Britton, 1993). En estos organismos, los carotenoides actúan como pigmentos auxiliares y también protegen frente a la fotooxidación provocada por ciertos radicales que se forman bajo la acción de la luz (Siefermann-Harms, 1987). Así, los carotenoides absorben luz entre las longitudes de onda de 450 y 570 nm y son capaces de transmitir la energía a las clorofilas colectando energía radiante en una región del espectro no cubierta por las mismas (Cogdell y Frank, 1987; Cogdell, 1988; Frank *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1992; Cogdell y Gardiner, 1993). Por otra parte, los carotenoides son capaces de absorber la energía de la clorofila en estado triplete que se forma como consecuencia de una alta irradiancia



y que en otro caso conduciría a la formación de oxígeno en estado singlete ($^1\text{O}_2$)



radical fuertemente oxidante capaz de reaccionar con lípidos, proteínas y otras macromoléculas causando daños irreparables y conduciendo finalmente a la muerte celular. De la misma manera, los carotenoides pueden absorber la energía de excitación del oxígeno singlete directamente, si éste se formara, evitando así la acción del mismo (Krinsky, 1979; Davidson y Cogdell, 1981).

En el caso de plantas, hay numerosas evidencias que apoyan un papel fotoprotector del ciclo de las xantofilas disipando el exceso de energía de excitación en las antenas fotosintéticas. Bajo condiciones de exceso de energía lumínica, la zeaxantina se acumula a partir de la violaxantina a través de dos pasos de de-epoxidación y su acumulación se correlaciona con una rápida disipación no radiante del exceso de energía de excitación de las clorofilas antenas (Demming-Adams, 1990; Deming-Adams y Adams, 1990). De la zeaxantina se cree además, que pueda ser un fotorreceptor de luz azul en coleóptilos de maíz (Quinones y Zeiger, 1994). También en plantas algunos de estos compuestos oxigenados (xantofilas) son precursores del ácido abscísico o ABA (Rock y Zeevaart, 1991; Rock *et al.*, 1992), una fitohormona que interviene en numerosos procesos de desarrollo y de respuesta a estrés y por otra parte, algunos carotenoides aparecen en tejidos no fotosintéticos coloreando flores y frutos (Britton, 1983).

En animales, que no sintetizan carotenoides, éstos se ingieren a través de la dieta y cumplen diversas funciones. Así, en mamíferos el β -caroteno constituye la fuente mayoritaria de vitamina A (retinol) (Britton, 1983; Frickel, 1985) de la que es precursor y también se postula un posible papel de algunos carotenoides en la potenciación del sistema inmunológico (Bendich, 1989) así como en la prevención de ciertos tipos de cáncer debido a sus propiedades antioxidantes (Lachance, 1988; Krinsky, 1989; Matheus-Roth *et al.*, 1991). En algunos animales, estos compuestos son metabolizados en otros que contribuyen a la coloración externa como ocurre con algunos crustáceos, insectos, peces y pájaros (Britton, 1983).

1.1.2 Biosíntesis de los carotenoides

1.1.2.1. Ruta de síntesis de carotenoides

Los carotenoides son compuestos terpenoides formados generalmente por la unión de 8 moléculas de isopreno (C_{40}) y contienen una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo de la molécula, responsable del color y de las propiedades de absorción de estos compuestos. Los carotenoides con al menos 7 enlaces dobles conjugados absorben en el espectro visible. Los carotenos no contienen átomos de oxígeno y pueden ser lineales o cíclicos con uno o dos anillos terminales; mientras que las xantofilas son derivados oxigenados de los carotenos. También existen ésteres y

carotenoides glicosilados. El esqueleto C₄₀ se puede alargar en 5 ó 10 carbonos o acortarse dando apocarotenoides (Goodwin, 1980; Goodwin y Britton, 1988).

La ruta biosintética de los carotenoides en *Synechocystis* se muestra en la figura 1. Esta ruta (revisada en Armstrong, 1997 y Sandmann, 1994), presenta pasos comunes con la de formación de otros isoprenoides. Los primeros pasos de la ruta se han conservado a lo largo de la evolución (Armstrong, 1994).

El precursor de todos los carotenoides es el isopentenil pirofosfato (IPP) que generalmente se sintetiza a partir del ácido mevalónico (MVA) (Qureshi y Porter, 1981). Sin embargo en cloroplastos de algas y plantas superiores así como en algunos tipos de bacterias, incluidas cianobacterias, el IPP se sintetiza a partir de gliceraldehído fosfato y piruvato a través de una ruta alternativa independiente del MVA (Rohmer *et al.*, 1993; Schwender *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Posteriormente, el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) lo que, junto a la adición de 3 moléculas más de IPP, conduce a la síntesis de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) apareciendo geranyl pirofosfato (GPP) y farnesil pirofosfato (FPP) como intermediarios. Estas condensaciones 1-4' son catalizadas por prenil transferasas (Kleinig, 1989). En plantas, parece que una sola enzima, GGPP sintetasa, es la responsable de todos los pasos desde DMAPP hasta GGPP (Dogbo y Camara, 1987; Laferrière y Beyer, 1991).

El primer paso específico en la biosíntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de GGPP para producir prefitoeno pirofosfato (PPPP) (Goodwin, 1980; Britton, 1983). Tras la eliminación del pirofosfato, el GGPP se convierte en fitoeno (C₄₀), que carece de color y se considera el primer carotenoide. En el caso de plantas, algas y algunos hongos el fitoeno aparece como 15-*cis*-fitoeno, mientras que algunos microbios producen mezclas de isómeros que pueden incluir todo-*trans* y 9-*cis*-fitoeno (Bramley y Mackenzie, 1988; Britton, 1988; Ben-Amotz *et al.*, 1988). En todos los casos, esta reacción de dos pasos es catalizada por la fitoeno sintasa, una enzima soluble que sería el primero específico de la ruta biosintética de los carotenoides.

Aunque existen diferencias estructurales entre las fitoeno sintasas de cianobacterias y plantas frente a la de otros microorganismos, los dos tipos contienen dos secuencias conservadas que están presentes en prenil transferasas de otros organismos y

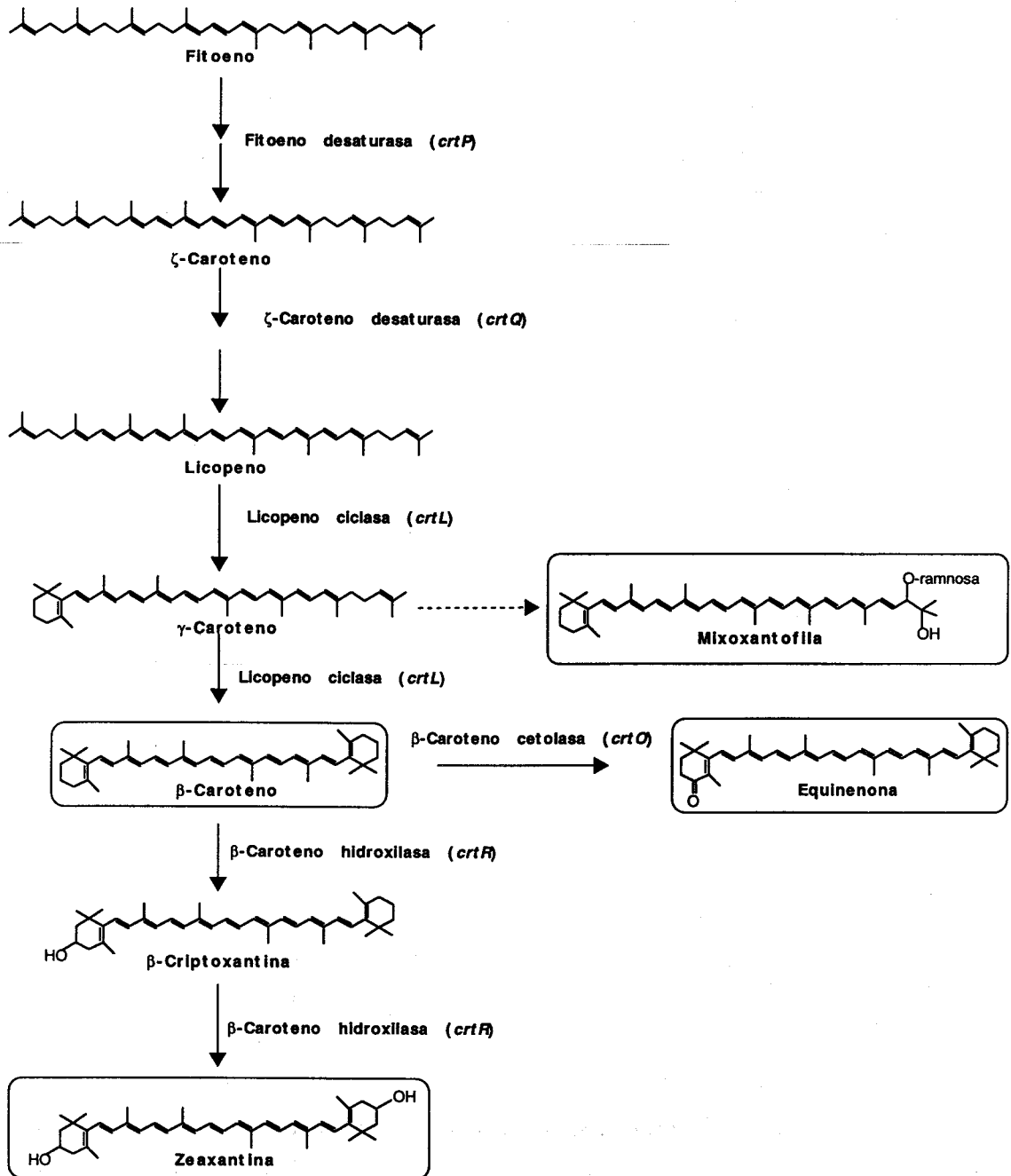


Figura 1. Ruta de biosíntesis de carotenoides en *Synechocystis*.

Los principales carotenoides acumulados aparecen en recuadros. La ruta desde γ -caroteno hasta mixoxantofila requiere varios pasos aún no caracterizados.

podrían estar involucradas en la eliminación del pirofosfato durante la condensación de las dos moléculas de GGPP (Bartley *et al.*, 1991; Carattoli *et al.*, 1991; Math *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 1993).

Las bacterias fotosintéticas anoxygenicas (*Rhodobacter capsulatus*), las no fotosintéticas (*Erwinia* sp.) y los hongos, tienen una única enzima, fitoeno desaturasa de tipo CrtI (figura 2), para desaturar el fitoeno tres o cuatro veces y dar neurosporeno o licopeno respectivamente. Los organismos con fotosíntesis oxygenica (cianobacterias, algas y plantas superiores) convierten el fitoeno en licopeno a través de dos juegos de reacciones catalizados por dos enzimas distintas que actúan secuencialmente (figura 2). Las dos primeras desaturaciones están catalizadas por la fitoeno desaturasa de tipo CrtP, un único polipéptido unido a membrana que cataliza la conversión de 15-*cis*-fitoeno en ζ -caroteno via fitoflueno (Jones y Porter, 1986; Beyer *et al.*, 1989). En este paso también debe existir una isomerización *cis-trans* puesto que el ζ -caroteno aparece generalmente en la forma *todo-trans*. La estructura primaria de la enzima cianobacteriana presenta una identidad de residuos del 65% con la de algas y plantas

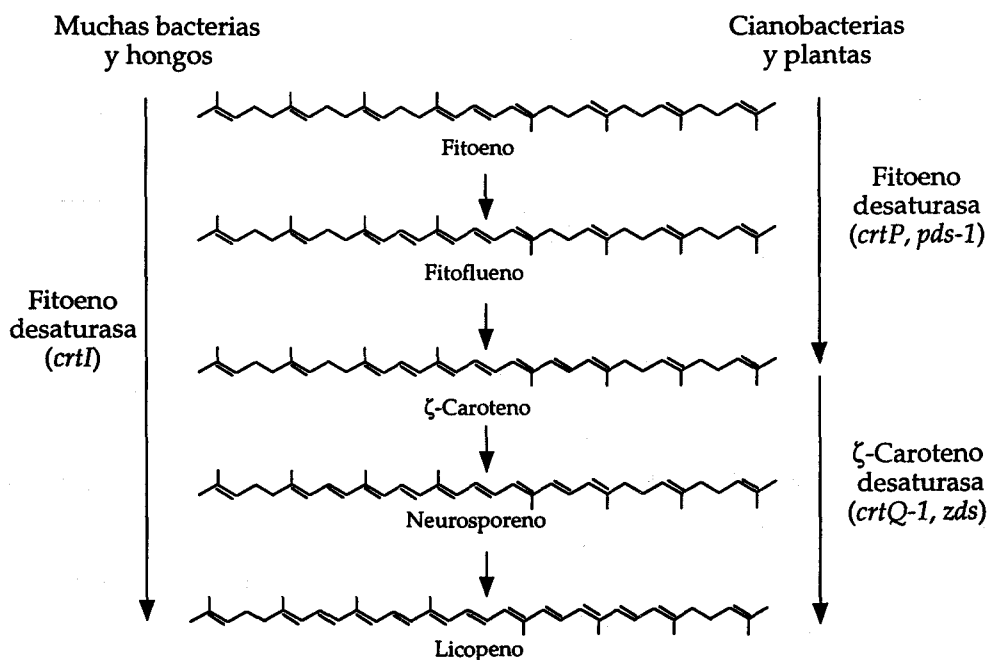


Figura 2. Secuencia de desaturación de fitoeno a licopeno.

Se indican las enzimas que participan y el gen correspondiente, entre paréntesis, según la nomenclatura establecida para bacterias sin fotosíntesis oxygenica y hongos o para cianobacterias y plantas.

(Pecker *et al.*, 1992a; Pecker *et al.*, 1993) y es inactivada por los mismos inhibidores (Sandmann y Böger, 1989), por lo que es muy probable que los polipéptidos de plantas y cianobacterias tengan las mismas propiedades moleculares y bioquímicas.

En todas las fitoeno desaturasas cuya estructura primaria ha sido analizada, aparece una secuencia conservada de unión a FAD (Pecker *et al.*, 1992a; Pecker *et al.*, 1993). Dado que esta enzima se localiza en la membrana, debe existir un componente redox adicional soluble que emplearía NADP (Mayer *et al.*, 1992) u otro transportador de hidrógeno y electrones tipo quinona. Dentro de los miembros de cada clase de fitoeno desaturasas (tipo CrtI o tipo CrtP) existe alto grado de homología pero no así entre los dos tipos de enzima, a excepción del mencionado sitio de unión del cofactor FAD (Sandmann, 1994). Además, ambos tipos de enzima presentan distinta sensibilidad frente a los mismos inhibidores. Estos datos han permitido sugerir que las dos clases de genes de fitoeno desaturasas no derivan de un ancestro común, sino que se han originado por evolución convergente (Pecker *et al.*, 1992a).

En cianobacterias, algas y plantas, las dos siguientes desaturaciones son llevadas a cabo por la enzima ζ -caroteno desaturasa, que cataliza el paso desde ζ -caroteno hasta licopeno via neurosporeno. Aunque se desconoce el mecanismo de reacción a nivel molecular, parece que se trata también de un único polipéptido (Linden *et al.*, 1993). Mientras que la secuencia de aminoácidos deducida para la ζ -caroteno desaturasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 es homóloga a las fitoeno desaturasas de tipo CrtI (Linden *et al.*, 1994), la enzima de plantas es homóloga a las de tipo CrtP. Ambas contienen un motivo de unión a dinucleótidos similar al encontrado en las fitoeno desaturasas.

A través de dos reacciones de ciclación sucesivas la primera de las cuales rinde γ -caroteno, el licopeno es convertido en β -caroteno. Parece que en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Cunningham *et al.*, 1993) así como en plantas (Camara y Dogbo, 1986) esta enzima está formada por un único polipéptido. La licopeno ciclasa es inhibida específicamente por compuestos de tipo trietilamina tales como CPTA y MPTA (Sandmann y Böger, 1989) Las cianobacterias sólo pueden introducir anillos del tipo β , de manera que no presentan ϵ -caroteno, δ -caroteno o α -caroteno ni tampoco sus derivados oxigenados. Para que se produzcan reacciones de ciclación es indispensable la desaturación completa, como ocurre con el licopeno, o de al menos la mitad de la molécula, como es el caso del neurosporeno.

Las licopeno ciclasas de bacterias no fotosintéticas y las de organismos con fotosíntesis oxigénica son estructuralmente diferentes, pero ambos tipos presentan un motivo de unión a dinucleótidos que podría estar involucrado en la interacción con FAD/NADP como cofactor (Cunningham *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 1993).

Las xantofilas se sintetizan a partir de precursores cíclicos o acíclicos por introducción de grupos oxigenados tipo hidroxilo, metoxi, oxo, epoxi, carboxi y grupos aldehídos. En el caso concreto de la cianobacteria utilizada en este estudio, *Synechocystis* sp. PCC 6803, las xantofilas acumuladas son de dos tipos (figura 1), por una parte los derivados hidroxilados zeaxantina y mixoxantofila y, por otra la equinenona, con un grupo ceto.

La formación de xantofilas requiere oxígeno molecular y es potenciada por una mezcla de cofactores que lleve 2-oxoglutarato, ácido ascórbico y Fe^{2+} siendo éste último el que más influye en la actividad enzimática (Fraser *et al.*, 1997).

1.1.2.2 *Biología molecular de la síntesis de carotenoides*

Recientemente se han caracterizado genes involucrados en la ruta biosintética de los carotenoides en una gran diversidad de organismos (revisión en Armstrong y Hearst, 1996 y Armstrong, 1997).

En algunos organismos procariotas estos genes (genes *crt*) se encuentran físicamente ligados formando grupos, el primero de los cuales, identificado hace más de 15 años (Yen y Marrs, 1976), corresponde al de la bacteria fotosintética anoxigénica *Rhodobacter capsulatus*. La secuenciación de esta agrupación reveló la presencia de 8 genes formando cuatro operones y de otro gen más (*crtJ*) a 12 kb de distancia (Armstrong *et al.*, 1989; Armstrong, 1997). Posteriormente se clonaron los grupos de genes de las bacterias no fotosintéticas *Erwinia herbicola* (Sandmann *et al.*, 1990; Hundle *et al.*, 1991; Schnurr *et al.*, 1991), *Erwinia uredovora* (Misawa *et al.*, 1990) y *Myxococcus xanthus* (Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993; Botella *et al.*, 1995) En todos los casos, los genes clonados codifican enzimas para la ruta completa de síntesis de carotenoides en estos organismos y, en *M. xanthus*, también se identifican genes reguladores.

Los trabajos desarrollados con *Rhodobacter spheroides* (Garí *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1994), *Mycobacterium aurum* (Houssaini-Iraqi *et al.*, 1993) y *Thermus thermophilus* (Tabata *et al.*, 1994) definen agrupaciones génicas que han sido

caracterizadas parcialmente, pero en el último organismo los genes están en un plásmido a diferencia de lo que ocurre en el resto.

En cianobacterias los carotenoides son esenciales, por lo que la dificultad a la hora de conseguir mutantes afectados en las funciones de los correspondientes genes ha hecho que se utilicen otras estrategias para abordar su clonación. Una de ellas la constituye el aislamiento de mutantes resistentes a herbicidas que actúan específicamente sobre enzimas de la ruta biosintética de carotenoides. De esta manera, a partir de mutantes resistentes a norflurazón de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Linden *et al.*, 1990), se aisló el gen *crtP* que codifica la fitoeno desaturasa (Chamovitz *et al.*, 1990). El gen se clonó de la misma forma en *Synechocystis* sp. PCC 6803 por nuestro grupo (Martínez-Férez y Vioque, 1992). En ambas cianobacterias se encontró que los genes *crtB*, que codifican la fitoeno sintasa, están "aguas abajo" del gen *crtP* (Bartley *et al.*, 1991; Martínez-Férez *et al.*, 1994a). Por hibridación heteróloga con sondas cianobacterianas, se aislaron los genes *crtP* de un alga (Pecker *et al.*, 1993) y de plantas superiores (Bartley *et al.*, 1991; Pecker *et al.*, 1992a; Huguene y *et al.*, 1992).

Usando mutantes resistentes a inhibidores de la licopeno ciclasa se aisló el correspondiente gen (*crtL*) en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Cunningham *et al.*, 1993). Este gen no mapea en las proximidades de los genes *crtP* y *crtB*.

La complementación *in vivo* de cepas de *E. coli* que acumulan diferentes intermediarios de la ruta de biosíntesis de carotenoides, ha constituido otra de las técnicas más comunes de clonación de genes *crt* cianobacterianos. Así, este sistema ha servido para clonar el gen *crtQ-1* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Linden *et al.*, 1993).

La caracterización molecular de los genes eucariotas para esta ruta empezó con el aislamiento de un cDNA de tomate que se expresa durante la maduración del fruto (Ray *et al.*, 1987) y que posteriormente se identificaría como el homólogo a *crtB* (Bird *et al.*, 1991; Bartley *et al.*, 1992). Las técnicas de aislamiento de productos de PCR basados en secuencias de cianobacterias (Bartley *et al.*, 1991), la búsqueda de proteínas en genotecas de expresión con anticuerpos específicos (Bouvier *et al.*, 1994; Huguene y *et al.*, 1992; Kuntz *et al.*, 1992), el uso de transposones (Buckner *et al.*, 1990) y el paseo cromosómico en *N. crassa* (Schmidhauser *et al.*, 1990) han servido para identificar otros cDNAs y genes eucariotas involucrados en la biosíntesis de carotenoides.

Recientemente se han clonado los genes *crtW* de las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum*, por complementación heteróloga en *E.coli*, y de *Alcaligenes* PC-1, por hibridación con una sonda del anterior (Misawa *et al.*, 1995a). Este gen codifica una cetolasa que introduce simétricamente dos grupos ceto en la molécula de β -caroteno para dar cantaxantina via equinenona. En el caso de *A. aurantiacum* el gen *crtW* forma parte de un operón compuesto por 5 genes involucrados en la ruta (Misawa *et al.*, 1995b). También por complementación heteróloga en *E. coli*, se clonó el mismo gen en el alga *Haematococcus* (Kajiwara *et al.*, 1995; Lotan y Hirschberg, 1995) y, por último, el gen para la hidroxilasa que cataliza el paso desde β -caroteno hasta zeaxantina y el de la ϵ -ciclase de licopeno en *Arabidopsis thaliana* (Sun *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996).

1.1.2.3. Regulación de la síntesis de carotenoides.

La síntesis de carotenoides es un proceso regulado. Existen varios factores ambientales y de desarrollo que controlan la síntesis y acumulación de estos pigmentos (Bramley y Mackenzie, 1988).

El factor regulador más estudiado ha sido la luz, que se sabe influye en la síntesis de carotenoides de numerosos organismos desde bacterias hasta plantas (Harding y Shropshire, 1980). En general, la luz induce la síntesis de estos compuestos si bien en el caso de *Rhodobacter*, los carotenoides se acumulan en condiciones de baja intensidad lumínica o en anaerobiosis (Armstrong, 1995; Armstrong, 1997).

En cianobacterias, la intensidad y calidad de la luz provocan cambios en la composición y cantidad de carotenoides. Tales cambios constituyen un mecanismo de adaptación a las condiciones de alta luz. Las diferentes especies cianobacterianas presentan respuestas también diferentes frente a la intensidad de luz. Así, no todas ellas acumulan los mismos pigmentos en tales condiciones. En cuanto a la calidad de la luz, sólo se ha estudiado la regulación por luz verde-azulada de la acumulación de zeaxantina en *Synechococcus* sp. WH 7803 (Hirschberg y Chamovitz, 1994).

También en cianobacterias existen otros factores reguladores de la síntesis de carotenoides como son la disponibilidad de nitrógeno, los cambios en la salinidad del medio o los cambios en la temperatura de cultivo (Hirschberg y Chamovitz, 1994).

En plántulas, la carotenogénesis está también fotorregulada pero esta regulación parece ser sólo una parte del proceso de desarrollo de cloroplastos inducido por luz (Goodwin, 1977; Kirk y Tilney-Bassett, 1978).

A nivel molecular, los estudios se reducen a la transcripción de los genes de biosíntesis de carotenoides en *M. xanthus*, *N. crassa*, *Rhodobacter* y *L. esculentum*. En *M. xanthus* el promotor del gen *carC* (fitoeno desaturasa) se induce por luz azul o deficiencia de carbono cuando los cultivos se encuentran en fase estacionaria (Fontes *et al.*, 1993; Hodgson y Murillo, 1993) y el promotor de la agrupación génica *carA-carB* que también se induce por luz azul, es insensible a la disponibilidad de carbono (Balsalobre *et al.*, 1987; Hodgson y Murillo, 1993). También en *Myxococcus* se han identificados dos ORFs que presentan dominios altamente homólogos con el dominio de unión a DNA de los miembros de la familia MerR de reguladores transcripcionales y se ha determinado que en un mutante deficiente en la regulación por luz de los genes *car*, uno de estos dominios está afectado (Botella *et al.*, 1995). En *N. crassa*, los transcritos de los genes *al-1* (fitoeno desaturasa) y *al-3* (GGPP sintetasa) aumentan en respuesta a la iluminación con luz azul (Schmidhauser *et al.*, 1990; Baima *et al.*, 1991). En *Rhodobacter*, los transcritos de los genes *crtA*, *crtC*, *crtD* y *crtF* (implicados en síntesis de esferiodeno y esferoidenona) y las actividades de los promotores de *crtA* y de *crtEF* aumentan moderadamente en condiciones de anaerobiosis (Armstrong, 1994). Además, en *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* se han identificado dos genes reguladores, *ppsR* y *tspO*, cuyos productos de expresión reprimen varias veces la expresión de los genes *crt*, *bch* y *puc* en condiciones de crecimiento aeróbico (Armstrong, 1997). En *L. esculentum* los niveles de los transcritos del gen *PDS* aumentan de forma drástica en condiciones de alta intensidad lumínica (Pecker *et al.*, 1992b) y los de los genes *PSY1* y *PSY2* son mayores en plántulas crecidas en luz que en tejidos etiolados (Bartley y Scolnik, 1993). Por otra parte, se ha visto que la acumulación de carotenoides durante la maduración del fruto se corresponde con un incremento en la expresión de los genes *PSY1* y *PDS* como también ocurre en flores (Pecker *et al.*, 1992a; Giuliano *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1994; Corona *et al.*, 1996; Pecker *et al.*, 1996;) mientras que el transcrito del gen *LCY* decrece (Pecker *et al.*, 1996). El mRNA del gen *PSY2* no parece responder a las señales de maduración del fruto y se expresa fundamentalmente en tejidos verdes (Bartley y Scolnik, 1993). En *Capsicum* se encuentra un incremento en la expresión de los genes *GGPS*, *PSY* y *PDS* durante la maduración del fruto (Kuntz *et al.*, 1992; Römer *et al.*, 1993).

1.2. LAS CIANOBACTERIAS

1.2.1. Características generales.

Las cianobacterias constituyen un grupo de procariotas cuya característica más destacable es la capacidad para desarrollar fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas y algas. Aunque en general contienen sólo clorofila *a* (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) en algunos casos presentan también clorofila *b* (proclorofitas).

Las cianobacterias son un grupo antiguo y extraordinariamente diverso en morfología, metabolismo y hábitat. Los primeros fósiles atribuidos a cianobacterias datan del Precámbrico, existiendo además datos geoquímicos que permiten postular un papel esencial de estos microorganismos en el paso de la atmósfera terrestre desde un estado reductor primitivo al actual estado oxidante (Hayes, 1983; Schopf *et al.*, 1983; Walter, 1987). Aparecen en casi todos los ecosistemas examinados y esta amplia distribución refleja una gran variedad de especies con diversas propiedades morfológicas y fisiológicas. Su diversidad genética queda reflejada en el contenido de pares de bases guanina-citosina (G+C) cuyo porcentaje cubre todo el rango de valores encontrados para procariotas, mientras que el tamaño del genomio de las formas más complejas sobrepasa al de cualquier otro grupo de bacterias (Herdman *et al.* 1979). Muchas especies cianobacterianas son poliploides presentando entre 10 y 15 copias del genomio haploide por célula (Herdman *et al.*, 1979; Labarre *et al.*, 1989) y casi todas poseen también plásmidos, cuyo papel fisiológico así como la mayoría de funciones que codifican se desconocen (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987).

Las cianobacterias presentan una pared celular típica de bacterias gram negativas (Woese, 1987) y constituyen un filo de eubacterias situado en la radiación de las mismas cerca de bacterias gram positivas y bacterias purpúreas (Woese, 1987; Schleifer y Ludwig, 1989). Desde el punto de vista evolutivo, las cianobacterias se consideran casi con total certeza, descendientes del linaje procariótico primitivo que dio lugar a los cloroplastos (Bonen y Doolittle, 1975; Giovannoni *et al.*, 1988; Douglas y Turner, 1991), apoyando así la teoría endosimbionte (Gray, 1989).

En cuanto a taxonomía interna, en un principio se clasificaron atendiendo a caracteres morfológicos fundamentalmente reconociéndose dos grandes grupos: cianobacterias unicelulares y cianobacterias filamentosas (Rippka *et al.*, 1979). Dentro del grupo de cianobacterias unicelulares se encuentran la sección I, de reproducción por división binaria o gemación y la sección II, de reproducción por fisión múltiple. El grupo de cianobacterias filamentosas engloba a la sección III, no formadoras de heterocistos (células especializadas en la fijación de dinitrógeno); la sección IV, formadoras de heterocistos sin ramificaciones verdaderas y la sección V, formadoras de heterocistos y con ramificaciones verdaderas. De esta clasificación sólo las secciones II, IV y V son grupos coherentes desde el punto de vista filogenético, como se ha podido determinar con el análisis de secuencias de RNA ribosómico 16S (Giovannoni *et al.*, 1988). En la actualidad, la taxonomía de las cianobacterias se encuentra en plena evolución y se está apoyando en estudios de marcadores quimiotaxonómicos (ácidos grasos, carotenoides, etc.) y en análisis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) que puedan reflejar mejor las relaciones evolutivas existentes entre las distintas especies cianobacterianas (Wilmotte, 1994).

El aparato fotosintético de las cianobacterias se localiza en un sistema de membranas denominadas tilacoidales y se organiza de manera similar al del cloroplasto. Así, está estructurado en dos fotosistemas (PSI y PSII) conectados por una cadena de transportadores de electrones que los conducen desde el H₂O como donador primario hasta el aceptor terminal que es la ferredoxina (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Algunas estirpes de cianobacterias pueden utilizar también H₂S como donador de electrones, desarrollando en este caso fotosíntesis anoxigénica (Schmidt, 1988). En cuanto a la composición de pigmentos fotosintéticos las cianobacterias además de clorofila *a*, poseen ficobilinas como pigmentos antena (Sherman *et al.*, 1987) que también aparecen en algas rojas (Wolfe *et al.*, 1994) y carotenoides, los cuales se localizan en los complejos antena, en los centros de reacción de los fotosistemas (Goodwin, 1980; Britton, 1993) y también en la membrana externa (Hirschberg y Chamovitz, 1994).

En su gran mayoría las cianobacterias son autótrofas estrictas, sin embargo existen estirpes capaces de crecer heterotróficamente utilizando compuestos orgánicos reducidos como fuente de carbono y energía, bien en oscuridad (quimioheterotrofia), bien en presencia de luz (fotoheterotrofia) y, por último, hay cianobacterias que pueden

crecer mixotróficamente, esto es, utilizando azúcares y realizando fotosíntesis de manera simultánea (Rippka *et al.* 1979).

La fijación de CO₂, al igual que en plantas, se lleva a cabo a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Dentro del metabolismo del carbono presentan la peculiaridad de poseer un ciclo de Krebs incompleto carente de las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA reductasa (Pearce *et al.*, 1969), de manera que funciona como ruta biosintética y limita el número de sustratos orgánicos utilizables por estos procariotas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Smith, 1982). La degradación de azúcares se lleva a cabo a través de una ruta alternativa que es la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Smith, 1982). Como fuente de nitrógeno las cianobacterias generalmente usan nitrato, nitrito y amonio (Guerrero y Lara, 1987), aunque algunas especies pueden utilizar también urea y determinados aminoácidos (Flores y Herrero, 1994; Montesinos *et al.*, 1995) o bien pueden fijar dinitrógeno en condiciones de aerobiosis (Stewart, 1980). En este último caso, para proteger al complejo de la nitrogenasa de la inactivación irreversible por O₂, algunas especies filamentosas han separado espacialmente los procesos de fotosíntesis y fijación de N₂. Así, este último se realiza en unas células diferenciadas especiales denominadas heterocistos que se desarrollan en condiciones en que el nitrógeno combinado es limitante (Wolk, 1982). En los casos de cianobacterias fijadoras de N₂ que no diferencian heterocistos, parece que la estrategia más común de protección de la nitrogenasa es la separación temporal entre la fotosíntesis y la fijación de N₂, además de un incremento en el metabolismo respiratorio para crear un ambiente microaeróbico (Fay, 1992).

Muchas cianobacterias unicelulares son transformables de manera natural e incorporan el DNA exógeno a su genomio de manera estable por recombinación homóloga (Porter, 1986). La transformación unida al desarrollo de otras técnicas de transferencia genética, como la conjugación (Wolk *et al.*, 1984; Flores y Wolk, 1985) o la electroporación (Thiel y Poo, 1989) han hecho de las cianobacterias organismos ideales para el estudio de la fotosíntesis desde el punto de vista molecular.

1.2.2. *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 es una cianobacteria unicelular, poliploide, móvil y no fijadora de dinitrógeno, que pertenece a la sección I de la clasificación de Rippka *et*

al. (1979). Inicialmente descrita como fotoheterótrofa (Rippka, 1972), posteriormente se ha visto que puede crecer en presencia de glucosa sin iluminación continua siendo suficiente un pulso de luz blanca cada 24 horas (Anderson y McIntosh, 1991). A esta forma de crecimiento se le ha llamado "crecimiento heterotrófico activado por luz" y parece ser independiente de la actividad de cualquiera de los dos fotosistemas (Anderson y McIntosh, 1991).

Synechocystis sp. PCC 6803 es competente de manera natural (Grigorieva y Shestakov, 1982), y puede ser transformada con DNA exógeno. La transformación en ésta al igual que en otras cianobacterias, es dependiente de la concentración de DNA exógeno presentando una cinética que se satura con una concentración de DNA de 50 mg/ml (Grigorieva y Shestakov, 1982; Porter, 1986). *Synechocystis* sp. PCC 6803 posee un sistema de recombinación homóloga que permite la sustitución de genes por copias mutadas y, además, posee varios plásmidos residentes que han permitido el desarrollo de distintos sistemas de transferencia de material genético. Utilizando secuencias de estos plásmidos se han construido vectores de clonación que permiten la integración de DNA exógeno por recombinación entre el vector y el plásmido residente (Chauvat *et al.*, 1986), vectores autorreplicativos (Chauvat *et al.*, 1988), vectores para el estudio de promotores (Ferino y Chauvat, 1989) y plásmidos conjugativos entre *Synechocystis* y *Synechococcus* (Marrachini *et al.*, 1993).

Las características de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 han posibilitado la obtención de mutantes deficientes en fotosíntesis, facilitando el estudio de este proceso. Así, la capacidad de crecimiento fotoheterótrofo ha permitido obtener mutantes afectados en el PSII (Debus *et al.*, 1988a; 1988b; Jansson *et al.*, 1987; Vermaas *et al.*, 1986; 1988; Williams, 1988; Chauvat *et al.*, 1989), fotosistema no requerido para este tipo de crecimiento (Rippka, 1972). También se han obtenido mutantes que afectan a la actividad del PSI y a la de ambos fotosistemas simultáneamente que son viables en condiciones de crecimiento heterotrófico activado por luz (Smart *et al.*, 1991; Smart y McIntosh, 1993; Smart *et al.*, 1994).

El genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha sido recientemente secuenciado en su totalidad (Kaneko *et al.*, 1996) facilitando así la clonación de nuevos genes que puedan ser de interés en el estudio de esta cianobacteria a nivel molecular.

1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Los carotenoides son moléculas de elevado interés biológico y aplicado por ser los precursores tanto del ácido abscísico, una importante hormona vegetal, como de la vitamina A que constituye un elemento esencial en la dieta de los mamíferos. Además, existen estudios epidemiológicos que muestran que una dieta rica en carotenoides está relacionada con una reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, alteraciones coronarias y algunas enfermedades degenerativas y, por otra parte, su inocuidad para la salud permite que sean excelentes colorantes en la industria alimentaria. El estudio a nivel molecular de la síntesis de carotenoides resulta, pues, interesante, ya que el conocimiento de los genes implicados y de su regulación facilitan la producción biotecnológica de estas moléculas.

Las enzimas carotenogénicas son también blanco de numerosos herbicidas de manera que los genes correspondientes se pueden usar para manipular genéticamente plantas de cultivo y hacerlas resistentes a herbicidas concretos.

Cuando se inició este trabajo se estaba así mismo iniciando la caracterización de genes de la carotenogénesis y aún no se habían clonado los genes de la fitoeno sintasa, de la ζ -caroteno desaturasa y de la cetolasa de β -caroteno en ninguna planta o cianobacteria.

El organismo elegido ha sido la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 por sus propiedades que la hacen muy útil para nuestros objetivos, ya que presenta fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas y algas y es manipulable genéticamente de forma sencilla. Además, durante el desarrollo de este trabajo se ha publicado la secuencia completa (Kaneko *et al.* 1996) del genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esto ha facilitado la búsqueda sistemática de genes implicados en la carotenogénesis.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido el aislamiento de genes de la carotenogénesis en *Synechocystis* sp. PCC 6803, el análisis de la función de tales genes y el estudio de su regulación en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Los resultados que aquí se presentan han sido parcialmente publicados o están en

vías de publicación:

Martínez-Férez, I.M., Fernández-González, B., Sandmann, G. y Vioque, A. (1994)
Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. biophys. Acta*, **1218**, 145-152.

Fernández-González, B., Sandmann, G. y Vioque, A. (1997) A new type of asymetrically-acting β -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **272**, 9728-9733.

Breitenbach, J., Fernández-González, B., Vioque, A. y Sandmann, G. (1997) Higher-plant type ζ -carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* (en prensa).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. *Estirpes de cianobacterias utilizadas*

El organismo elegido para la realización de este trabajo ha sido la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, unicelular, poliploide, heterótrofa facultativa y perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica de Rippka *et al.* (1979).

2.1.1.2. *Cultivo de cianobacterias en medio líquido*

Para el cultivo líquido de cianobacterias se usó el medio BG11 descrito por Rippka *et al.* (1979), que consta de: NaHCO₃ 12 mM, NaNO₃ 17,6 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,24 mM, K₂HPO₄ 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM, citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg/ml, Na₂-EDTA 2,4 μM, H₃BO₃ 46 μM, MnCl₂ 9,1 μM, Na₂MoO₄ 1,6 μM, ZnSO₄ 0,8 μM, CuSO₄ 0,3 μM y CoCl₂ 0,2 μM.

El medio se preparó concentrado 100 veces conteniendo todos los componentes excepto el K₂HPO₄, el NaHCO₃ y el NaNO₃ que se añadieron en el momento de su uso y previamente a su esterilización en el autoclave.

Para los cultivos en medio líquido que se utilizaron como preinóculos de otros, para transformación o para extracciones de DNA, se utilizaron matraces erlenmeyers de 250 ml de capacidad con volúmenes de entre 25 y 100 ml de medio e inoculados con biomasa procedente de cultivos en medio sólido. Posteriormente fueron incubados en agitadores orbitales termostatizados a 30°C con agitación e iluminación continuas, siendo esta última proporcionada por tubos fluorescentes situados en la parte superior del incubador que emiten luz blanca con una intensidad luminosa de entre 25 y 30 μE m⁻² s⁻¹.

Cuando fue necesario usar distintas condiciones de iluminación las estirpes de cianobacterias fueron cultivadas como se ha descrito hasta que alcanzaron una absorbancia a 580 nm de 1,0. Posteriormente estos cultivos sirvieron como preinóculos de otros en frascos de Roux o en frascos de 250 ml, dependiendo del volumen final deseado,

que se incubaron en baños termostatzados a 30°C bajo iluminación continua de intensidad $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En estos casos la agitación se consiguió burbujeando el medio de cultivo con una mezcla aire-CO₂ en la proporción 95:1 (v/v) que garantiza, además, una correcta aireación. Cuando los cultivos alcanzaron la absorbancia deseada a 580 nm se distribuyeron volúmenes de 40 ml en tubos pyrex de 70 ml que se mantuvieron en baños termostatzados a 30°C y fueron burbujeados con la misma mezcla de aire-CO₂. Estos tubos se sometieron a las distintas intensidades lumínicas utilizadas en los experimentos para lo cual se incubaron situándolos a diferentes distancias de un foco Mazda de haluro de mercurio.

Para someter a las células a irradiación con luz ultravioleta, las distintas estirpes se cultivaron en medio líquido a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 30°C hasta que la absorbancia a 580 nm fue de 0,4. Se distribuyeron 5,61 ml de cada cultivo en placas de Petri de 5,2 cm de diámetro y se situaron a 5,4 cm o a 2,7 cm de una lámpara de mano Vilber Lourmat modelo VL-6M con la que se irradiaron durante distintos tiempos. La longitud de onda de emisión es de 312 nm.

Las estirpes de cianobacterias con resistencia a antibióticos fueron cultivadas, en todos los casos, en medio suplementado con los correspondientes antibióticos. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron de 25 $\mu\text{g/ml}$ para kanamicina y de 10 $\mu\text{g/ml}$ para cloranfenicol. La estirpe MPTA1 se cultivó en medio BG11 con 0,5 mM de nicotina.

2.1.1.3. *Cultivo de cianobacterias en medio sólido*

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el medio BG11 descrito en el apartado anterior solidificado añadiendo Bacto-agar (Difco) al 1% (p/v). El agar se esterilizó por separado del resto del medio y se mezcló con el mismo antes de verterlo en las placas de Petri. Las placas se incubaron en una cámara termostatzada a 30°C bajo iluminación continua con tubos fluorescentes de luz blanca que suministraron una intensidad de 25-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cuando fue necesario el medio de cultivo se suplementó con los antibióticos apropiados o con nicotina en las mismas concentraciones que las usadas para cultivos líquidos.

2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. *Estirpes de E. coli utilizadas*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y sus características más destacables se relacionan en la tabla 1

TABLA 1. Estirpes de *E. coli* usadas en este trabajo

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5 α	Estirpe supresora deficiente en recombinación usada para replicación de plásmidos. Permite la α -complementación con vectores derivados de pUC.	Hanahan, 1983
JM101	Estirpe utilizada en experimentos de complementación heteróloga.	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
MC1061	Estirpe <i>mcrB</i> usada para preparación de genotecas genómicas de <i>Synechocystis</i> .	Casadaban y Cohen, 1980.
XL-1Blue	Estirpe utilizada para el crecimiento de fagos λ -ZAP. Permite α -complementación.	Bullock <i>et al.</i> , 1987

2.1.2.2. *Cultivo de E. coli en medio líquido*

Los cultivos en medio líquido de *E. coli* se prepararon en el medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) compuesto por: NaCl 10 g/l, bacto triptona 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l y se incubaron a 37°C con agitación enérgica. El medio se esterilizó en el autoclave antes de usarlo.



Los cultivos se realizaron en tubos de 10 ml de capacidad con 3-5 ml de medio o en matraces erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio, y se incubaron en agitadores orbitales termostatizados.

Para el análisis de proteínas las estirpes de *E. coli* DH5 α (pTRCRT-O) y DH5 α (pTrc99A) fueron cultivadas hasta saturación en el medio LB descrito, los cultivos se diluyeron entonces hasta una absorbancia a 550 nm de 0,5 y se añadió IPTG a una concentración final de 2 mM. Posteriormente se incubaron 3 h a 37°C con agitación y las células se recogieron por centrifugación (15.000 x g, 15 min).

Para la preparación de células competentes, las distintas estirpes se cultivaron en el medio Ψ (Sambrook *et al.*, 1989) cuya composición es: bacto triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, MgSO₄ 16 mM y KCl 10 mM.

En el caso de infección por fagos, la estirpe XL1-Blue se cultivó en medio LB suplementado con MgSO₄ 10mM y maltosa al 0,2% (p/v).

Para el análisis de carotenoides, las estirpes de JM101 portadoras de distintos plásmidos con genes para la síntesis de pigmentos se cultivaron como se detalla a continuación: con una colonia de cada estirpe bajo estudio se inocularon 5 ml de medio LB y se incubó hasta saturación a 37°C y con agitación. 1 ml de estos cultivos sirvió como preinóculo de cultivos de 50 ml de LB en matraces erlenmeyers de 250 ml que se incubaron a 28°C, con agitación y en oscuridad hasta que la absorbancia a 550 nm fue de 0,5. En este momento se añadió IPTG a una concentración final de 2 mM y se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 48-60 h más. Finalmente se recogieron las células por centrifugación (15 min, 15.000 x g).

Todos los medios descritos se esterilizaron en el autoclave antes de ser usados. En aquellos casos en que las células portaban plásmidos confiriendo resistencia a antibióticos éstos se añadieron al medio de cultivo una vez esterilizado. Las concentraciones usadas fueron de 100 μ g/ml para ampicilina y de 50 μ g/ml para kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina.

2.1.2.3. Cultivo de *E. coli* en medio sólido.

Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se llevaron a cabo en placas de Petri sobre medio LB (descrito en el apartado anterior) solidificado con Bacto-agar (Difco) al 1,5% (p/v) y esterilizado en el autoclave. Las placas se incubaron en estufas de cultivo a 37°C o a 28°C y en oscuridad total en aquellos casos en que se pretendía ver coloración debida a síntesis de carotenoides.

Cuando fue necesario se añadieron antibióticos en las mismas concentraciones que las usadas para medio líquido.

2.2. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES

2.2.1. Preparación de extractos de *Synechocystis*

Para los ensayos de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) se prepararon extractos libres de células de *Synechocystis* a partir de células congeladas a -20°C correspondientes a 20 ml de cultivo líquido (apartado 2.1.1.2.), que se habían recogido por centrifugación a 4°C y 10.000 x g durante 10 min.

Para la preparación de los extractos, las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,8, se les añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM y se rompieron en un sonicador Sonifier 250 (Branson) a través de 3 pulsos de 30 s y 70 W de potencia. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 4°C y 18.000 x g durante 15 min y el sobrenadante libre de células se congeló en alícuotas de 100 µl de volumen a -20°C hasta su uso.

2.2.2. Preparación de extractos de *E. coli*

Con objeto de medir actividades de enzimas carotenogénicas se prepararon extractos celulares de JM101 portadoras de plásmidos para la síntesis de carotenoides. Una vez cultivadas y recolectadas como se describe en el apartado 2.1.2.2., las células se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 o en tampón fosfato potásico 200 mM a

pH 7,8 y se rompieron en una prensa French a 95 MPa. Finalmente los homogenados se trataron 15 min en hielo con DNasaI (5 µg/ml) y se utilizaron en los ensayos.

2.3 DETERMINACION DE LA INHIBICION *IN VIVO* DE LA SINTESIS DE CAROTENOIDES

Para determinar la inhibición *in vivo* producida por los herbicidas MPTA y nicotina sobre la síntesis de carotenoides en el mutante MPTA1 y en la estirpe silvestre de *Synechocystis*, se cultivaron ambas estirpes durante dos días en medio BG11 conteniendo distintas concentraciones de cada herbicida. Se extrajeron los carotenoides (apartado 2.6.2.) y se estimó su contenido en los cultivos (µg carotenoides/mg peso seco). La inhibición sufrida *in vivo* se determinó mediante una representación de Dixon modificada (Clark *et al.*, 1985), expresando las concentraciones de herbicida utilizadas en abscisas y los inversos de las concentraciones de carotenoides expresadas en tanto por ciento en ordenadas. Se consideró que el contenidos de carotenoides del cultivo sin herbicida era del 100%. Con esta aproximación se obtiene una recta que corta al eje de abscisas en un punto que determina la I₅₀ y representa la concentración de inhibidor que reduce al 50% el contenido de carotenoides.

2.4. ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

2.4.1. Actividad cloranfenicol aciltransferasa (CAT)

Los ensayos de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) se realizaron siguiendo el método descrito por Eastman (1987) basado en la difusión de los productos acetilados de la reacción hacia un líquido de centelleo inmisible con agua, donde quedan atrapados. Así, el ³H-acetil-coenzima A (³H-acetil-CoA) y el cloranfenicol no acetilado quedan en la fase acuosa. Utilizando un contador de centelleo es posible medir exclusivamente la radiactividad de los productos de la reacción. Este ensayo es continuo y se pueden realizar medidas a lo largo del tiempo para una misma reacción.

Para la realización de los ensayos se preparó una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 0,125 M, pH 7,8, cloranfenicol 1,25 mM y ³H-acetil-CoA 0,5 µCi/ml (New England Nuclear, actividad específica 200 mCi/mol). 50 µl de extractos de las estirpes apropiadas de *Synechocystis* (ver apartado 2.2.1.), previamente calentados

15 min a 65°C para inactivar deacetilasas que pudieran estar presentes, se mezclaron con 0,2 ml de mezcla de reacción y 5 ml de líquido de centelleo inmisible con agua (Econofluor, NEN) en un vial de contador de centelleo. Estos viales se incubaron a 37°C en un baño termostático y se midió la radiactividad presente a distintos tiempos usando un contador de centelleo Beckman LS 2800. Los extractos se diluyeron cuando fue necesario de manera que se obtuvieron cinéticas lineales a lo largo del tiempo. Como blanco de los ensayos se utilizaron 50 µl de Tris-HCl pH 7,8 sometidos al mismo tratamiento en vez de extractos celulares.

1 unidad de actividad CAT se define como la cantidad de enzima capaz de acetilar 1 nmol de cloranfenicol por minuto.

2.4.2. Actividad β-caroteno cetolasa

Para la determinación de la actividad β-caroteno cetolasa se utilizaron extractos de células de JM101 (apartado 2.2.2.) que llevaban el plásmido pCAR16ΔcrtX portando los genes necesarios para la síntesis de β-caroteno (Misawa *et al.*, 1995), y de células también de JM101 que llevaban el plásmido pTRCART-O para la expresión del gen de la cetolasa. El primer extracto se utilizó como fuente de sustrato para el ensayo proporcionando el equivalente a 600 ng de β-caroteno y el segundo, como fuente de enzima. Los ensayos se realizaron mezclando 250 µl de cada extracto y NADPH 2 mM e incubando esta mezcla durante 15 h a 30°C. La reacción se paró por la adición de 2,5 ml de metanol tras lo cual se extrajeron y analizaron los carotenoides presentes (ver apartados 2.6.2. y 2.6.3.).

2.4.3. Actividad ζ-caroteno desaturasa

La actividad ζ-caroteno desaturasa se determinó a partir de extractos de células de JM101 (apartado 2.2.2.) que llevaban el plásmido pTRC0940 portador del gen de la mencionada enzima de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los ensayos se llevaron a cabo mezclando 1 ml de extractos celulares con NADP 1 mM y NAD 1 mM como cofactores, 0,02% de butilhidroxitolueno como antioxidante, 3 mg de lípidos de soja (Raisig *et al.*, 1996) y 5 µg de ζ-caroteno o de neurosporeno. La mezcla se incubó a 30°C durante 15 h y posteriormente la reacción se paró añadiendo 3 ml de acetona y calentando 10 min a 50°C. Finalmente se extrajeron y analizaron los carotenoides

presentes (apartados 2.6.2. y 2.6.3.). El inhibidor de la ζ -caroteno desaturasa J852 [4-(3-metil-propoxil)-2-isopropilamino-6-metilpirimidina] se utilizó disuelto en metanol (Sandmann y Böger, 1989) a una concentración de 50 μ M.

2.5. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.5.1. Plásmidos y genotecas utilizados

Los plásmidos utilizados en la realización de este trabajo y que no fueron construidos durante su elaboración se relacionan en la tabla 2.

TABLA 2. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Resistencia	Características	Referencia/Fuente
ori-a f	Ap ^r	Plásmido portador de 271 pb del extremo 5' del gen <i>crtB</i> de <i>Synechocystis</i> .	Dra. Martínez Férez.
ori-a g	Ap ^r	Plásmido portador de 150 pb del extremo 5' del gen <i>crtB</i> de <i>Synechocystis</i> .	Dra. Martínez Férez.
pACCRT-EB	Cm ^r	Plásmido portador de los genes <i>crtE</i> y <i>crtB</i> de <i>Erwinia</i> para la síntesis de fitoeno.	Linden <i>et al.</i> , 1991.
pACCRT-EBP	Cm ^r	Plásmido que lleva los genes <i>crtE</i> y <i>crtB</i> de <i>Erwinia</i> y el gen <i>crtP</i> de <i>Synechococcus</i> para la síntesis de ζ -caroteno.	Linden <i>et al.</i> , 1993.
pACCRT-EBI _{Rc}	Cm ^r	Plásmido pACCRT-EBP con el gen <i>crtP</i> sustituido por el gen <i>crtI</i> de <i>Rhodobacter capsulatus</i> para la síntesis de neurosporeno.	Raisig <i>et al.</i> , 1996.
pACCAR16 Δ crtX	Cm ^r	Plásmido portador de los genes <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtY</i> de <i>Erwinia</i> necesarios para la síntesis de β -caroteno.	Misawa <i>et al.</i> , 1995a.

pAV12	Ap ^r	Plásmido portador de un fragmento de DNA del mutante AV1 de <i>Synechocystis</i> en el que se incluye el gen <i>crtP</i> .	Martínez-Férez, 1994.
pBluescript SK-	Ap ^r	Vector de clonación.	Stratagene, EE.UU.
pBluescriptII SK+	Ap ^r	Vector de clonación.	Stratagene, EE.UU.
pJS133	Ap ^r	Plásmido con el gen <i>cat</i> carente de promotor y flanqueado por múltiples sitios de clonación.	Shiau y Smith, 1988.
pKW1188	Km ^r	Plásmido con dos fragmentos de DNA genómico de <i>Synechocystis</i> flanqueando el gen <i>npt</i> y varios sitios de clonación. Permite la inserción de fragmentos de DNA por recombinación en una región no esencial del cromosoma.	Williams, 1988.
pMF1012	Km ^r Sm ^r	Plásmido derivado del pFF11 que lleva 208 pb de la región 5' del gen <i>crtP</i> de <i>Synechocystis</i> clonadas delante del gen <i>cat</i> sin promotor.	Martínez Férez, 1994.
pMF1021	Km ^r Sm ^r	Plásmido derivado del pFF11 con 240 pb del extremo 5' de <i>crtP</i> de <i>Synechocystis</i> clonados delante del gen <i>cat</i> sin promotor.	Martínez Férez, 1994.
pRKCRT-C	Tet ^r	Plásmido derivado del pRK404 portador del gen <i>crtC</i> de <i>R. capsulatus</i> que codifica una hidratasa de neurosporeno.	Fernández-González <i>et al.</i> , 1997
pRL161	Km ^r Ap ^r	Plásmido portador del gen <i>npt</i> del Tn5 flanqueado por distintos sitios de restricción.	Elhai y Wolk, 1988.

pTrc99A	Ap ^r	Vector de expresión en <i>E. coli</i> que posee el promotor <i>trc</i> .	Amman <i>et al.</i> , 1983. Amman <i>et al.</i> , 1988.
---------	-----------------	--	--

En este trabajo también se utilizó una genoteca de *Synechocystis* sp. PCC 6803 construida en el vector λ -ZAP II (Stratagene, EE.UU.) (Bullock *et al.*, 1987) que fue cedida por el Dr. Jack Preiss. La genoteca se construyó clonando fragmentos de DNA genómico de entre 6 y 9 kb en el punto *Eco* RI del vector, tiene menos del 10% de fagos no recombinantes y una titulación de 3×10^{10} unidades formadoras de placa/ml (u.f.p./ml).

2.5.2. Métodos de transformación genética

2.5.2.1. Transformación de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La transformación de *Synechocystis* se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Chauvat *et al.* (1986) con algunas modificaciones. La estirpe silvestre se cultivó en medio líquido (ver apartado 2.1.1.2.) hasta que la absorbancia a 580 nm fue de 1-1,5. Entonces se recogieron las células por centrifugación (10 min, $8.000 \times g$, temperatura ambiente) y se lavaron dos veces con el medio de cultivo BG11, esto es, se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial de BG11 y se centrifugaron en las mismas condiciones y, por último, se resuspendieron en un 1/10 del volumen inicial. 200 μ l de estas células concentradas se mezclaron con 1 μ g de DNA en tubos estériles de 5 ml de volumen y se incubaron durante 2-3 h a 30°C, con luz y agitación. Se añadieron 0,8 ml de medio BG11 y el contenido de cada tubo se vertió en sendas placas de Petri con medio BG11 sobre filtros de nitrocelulosa (Nucleopore REC-85). Las placas se incubaron a 30°C y con luz (ver apartado 2.1.1.3.) durante 12-20 h transcurridas las cuales, los filtros se cambiaron a placas con medio selectivo y se continuó la incubación hasta que aparecieron colonias de transformantes (1-2 semanas).

2.5.2.2. Transformación de *Escherichia coli*.

Antes de proceder a la transformación de *E. coli* se hizo necesario someter a las células a un tratamiento para permeabilizar su membrana frente al DNA exógeno, esto

es, para hacerlas competentes. Para tal fin se utilizó el método descrito por Hanahan (1983) consistente en inocular una colonia de la estirpe de *E. coli* de interés en un tubo de 10 ml conteniendo 5 ml medio Ψ (apartado 2.1.2.2.) e incubar a 37°C y con agitación durante 3-4 h hasta que la absorbancia a 580 nm es de 0,3. Con estos 5 ml se inoculan 100 ml de medio Ψ en un matraz erlenmeyer de 500 ml que se incubaba en las mismas condiciones hasta que la absorbancia a 580 nm es de 0,4-0,5. El cultivo se enfría en hielo durante 10 min, las células se recogen por centrifugación (4.000 x g, 5 min, 4°C) y se resuspenden en 30 ml de solución TJB I fría (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (v/v), pH 5,8 ajustado con ácido acético). Las células se recogen de nuevo en las mismas condiciones y se resuspenden en 4 ml de solución TJB II fría (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 25 mM, glicerol al 15% (v/v), pH 7,0 ajustado con NaOH). Ambas soluciones se esterilizan por filtración a través de filtros Millex GS (Millipore, 0,22 μ m de tamaño de poro).

Finalizado el tratamiento las células se distribuyen en alícuotas de 200 μ l que se congelan inmediatamente a -80°C. La frecuencia de transformación obtenida es de 10⁶-10⁷ transformantes/ μ g de DNA.

Para la transformación se mezclaron 100 μ l de células competentes descongeladas en hielo con un volumen máximo de 10 μ l de DNA en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Esta mezcla se incubó 15 min en hielo y se sometió seguidamente a un choque térmico de 2 min a 42°C. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó 1 h a 37°C. Por último se inocularon 100 ml de la mezcla de transformación en placas de Petri con medio LB suplementado con los antibióticos apropiados (apartado 2.1.2.2.) que se incubaron en estufas a 37°C hasta que aparecieron transformantes (12-16 h).

2.5.3. Infección de *E. coli* con fagos

Para la infección por fagos la estirpe XL1-Blue se cultivó en el medio descrito en el apartado 2.1.2.2. hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 1,0. Entonces 0,3 ml de cultivo se mezclaron con 0,2 ml de una preparación de fagos λ ZAP o R408 en tampón SM [NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, gelatina al 0,01% (p/v)] en tubos de 10 ml y se incubaron sin agitación 20 min a temperatura ambiente y 10 min más a 37°C, en el caso de λ -ZAP, o 15 min a 37°C en el caso de R408.

Para visualizar las calvas de lisis del fago λ -ZAP, se añadieron 3 ml de agar de cobertera [agar al 0,7% (p/v)] precalentado a 45°C y el contenido de cada tubo se vertió sobre placas de Petri conteniendo el medio lambda broth [bactotripton 10 g/l, NaCl 2,5 g/l, agar al 1,5% (p/v)]. Estas placas se incubaron a 37°C hasta que aparecieron las calvas (10-12 h).

2.5.4. Escisión *in vivo* de plásmidos del vector lambda ZAP

Para escindir los clones de la genoteca de *Synechocystis* en λ -ZAP (apartado 2.5.1.) en forma de plásmido se siguió el método descrito por Shopf *et al.* (1988). Según este método se mezclaron 0,2-0,35 ml de células XL1-Blue cultivadas como se describe en el apartado anterior, con 0,15-0,2 ml de un determinado clon en λ -ZAP y 2-30 μ l de una solución conteniendo el fago auxiliar R408. Esta mezcla preparada en tubos de 10 ml se incubó 15 min a 37°C sin agitación, se añadieron 5 ml de medio 2x YT (NaCl 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, bactotripton 16 g/l) y se incubó 2-6 h a 37°C con agitación. Después de esta incubación la mezcla se calentó a 70°C durante 20 min para matar a las bacterias e inactivar a los fagos λ parentales, se centrifugó 5 min a 1.000 x g y se decantó el sobrenadante a tubos estériles. Tal sobrenadante contiene los plásmidos escindidos del vector λ empaquetados como partículas f1 y el fago auxiliar.

Para obtener colonias, 0,2 ml de células XL1-Blue se infectaron con 0,2 ml de la mezcla de fagos f1 obtenida en el paso anterior (ver apartado 2.5.3.). Posteriormente se inocularon 100 μ l en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina (apartado 2.1.2.3.) y se incubaron a 37°C hasta que aparecieron colonias.

2.5.5. Aislamiento y análisis de DNA

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

Las minipreparaciones de DNA de *E. coli* se realizaron por el método de hervido descrito por Holmes y Quigley (1981). Las células correspondientes a 1,5 ml de cultivo se resuspendieron en 0,35 ml de solución STET [sacarosa 8% (p/v), Na₂-EDTA 50 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Tritón X-100 0,5% (v/v)] en un tubo Eppendorf. Se añadieron 25 μ l de lisozima (1 mg/ml), se agitó vigorosamente durante 3 s y se hirvió 40 s. Inmediatamente se centrifugó 10 min a 15.000 x g y se retiró el precipitado

de aspecto mucoso con la ayuda de un palillo de dientes estéril. El DNA presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo 50 µl de acetato sódico 3 M y 0,4 ml de isopropanol e incubando 2-10 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó 15 min a 15.000 x g y 4°C, el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, Na₂-EDTA 1 mM) en un tubo Eppendorf.

2.5.5.2. *Aislamiento de DNA total de cianobacterias*

Se procedió al aislamiento de DNA total de cianobacterias siguiendo el método de Cai y Wolk (1990).

Para ello se recogieron 50 ml de cultivo cianobacteriano por centrifugación (10 min, 12.000 x g) y se resuspendieron en 0,4 ml de TE en un tubo Eppendorf. Se añadieron 150 µl de perlas de vidrio (0,25-0,3 µm de diámetro) que habían sido lavadas con ácido nítrico y esterilizadas a 180°C, 20 µl de SDS al 10% (p/v) y 450 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Seguidamente se realizaron 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa y 1 min de incubación en hielo alternativamente. Se centrifugó la mezcla (15 min, 15.000 x g, temperatura ambiente). El sobrenadante se extrajo una vez con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v), se centrifugó (15.000 x g, 2 min) para separar las fases y la fase acuosa se decantó a tubos Eppendorfs nuevos. Seguidamente se extrajo 2 veces con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v) y la fase acuosa recuperada se precipitó 15 min en frío con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M. Se centrifugó 15 min a 15.000 x g y 4°C; el precipitado se resuspendió en 50 µl de TE y se trató con 1 µl de RNasa pancreática (1 mg/ml) durante 15 min a 37°. Tras este tratamiento se realizaron 3 extracciones sucesivas seguidas de precipitación como se ha descrito anteriormente. Se volvió a centrifugar 15 min a 15.000 x g y 4°C y el precipitado obtenido se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de TE en un tubo Eppendorf.

2.5.5.3. *Electroforesis de DNA en geles de agarosa*

Para separar fragmentos de DNA según su tamaño se realizaron electroforesis en geles de agarosa como se describe en Sambrook *et al.* (1989).

Los geles se prepararon disolviendo la agarosa en tampón TBE (Tris-borato 90 mM pH 8,3, Na₂-EDTA 2 mM pH 8,0) para lo cual la mezcla se calentó en un horno de microondas. Las concentraciones de agarosa usadas fueron de 0,6-1.5% (p/v) dependiendo del rango de resolución de tamaños requerido.

Las muestras sometidas a análisis se prepararon mezclando 1 volumen de DNA con 0,2 volúmenes de tampón de carga compuesto de glicerol al 7% (v/v), Na₂-EDTA 20 mM pH 8,0, azul de bromofenol al 0,08% (p/v) y xileno-cianol FF al 0,08% (p/v). Como patrones de tamaño se utilizaron restricciones de DNA del fago lambda con las enzimas *Pst* I o *Hind* III (apartado 2.5.7.1.).

Con objeto de visualizar el DNA los geles contenían 1 µg/ml de bromuro de etidio. Las bandas de DNA se pusieron de manifiesto iluminando los geles con un transiluminador de luz ultravioleta LKB™ modelo 2011 Macro Vue tras la electroforesis y se fotografiaron con un equipo Polaroid™ modelo MP4 o con una videocámara ImageStore 5000 (UVP).

Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos horizontales marca Bio-Rad modelos DNA Sub Cell™ y Mini Sub™ DNA Cell.

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

Los fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron utilizando el sistema GeneClean II (BIO 101 Inc., USA). Este sistema se basa en la solubilización de agarosa en presencia de NaI 6 M y la unión específica de DNA a perlas de vidrio. Para aislar el ácido nucleico se cortaron fragmentos del gel conteniendo el DNA de interés y se sometieron al correspondiente tratamiento siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.5.5. Determinación de la concentración de DNA en solución

En la determinación de la concentración de DNA de las distintas preparaciones se siguió el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989). Así, se midieron las absorbancias de las soluciones con el DNA a 260 y a 280 nm. La medida a

260 nm sirvió para estimar la concentración de DNA considerando que una absorbancia a 260 nm de 1 equivale a una preparación con 50 µg/ml de DNA de doble cadena. La relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm permitió estimar la pureza de la muestra ya que un valor inferior a 1,8 indica presencia de impurezas.

2.5.6. Aislamiento y análisis de RNA

2.5.6.1. Aislamiento de RNA total de Synechocystis

El RNA de cultivos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se aisló siguiendo una modificación del método de Mohamed y Jansson (1989). Las células correspondientes a 50-100 ml de cultivo líquido de *Synechocystis* se recogieron por centrifugación (10 min, 12.000 x g, 4°C) y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. A continuación el precipitado celular se descongeló en hielo y se repitió el ciclo de congelación-descongelación. Las células fueron entonces resuspendidas en 250 µl tampón de resuspensión (sacarosa 0,3 M, acetato sódico 10 mM pH 4,5), transferidas a un tubo Eppendorf y centrifugadas 5 min a 12.000 x g. El precipitado se resuspendió en 250 µl de tampón de resuspensión suplementado con 75 µl de Na₂-EDTA 250 mM pH 8,0 y se incubó 5 min en hielo. Se añadieron 375 µl de tampón de lisis [SDS 20% (p/v), acetato sódico 10 mM pH 4,5] y la mezcla se incubó 3 min a 65°C. Se añadieron 700 µl de fenol calentado a 65°C y se incubó a esa temperatura 3 min. Se centrifugó 2 min a 15.000 x g y la fase superior fue transferida a un tubo nuevo. El tratamiento con fenol caliente fue repetido 2 veces más. Posteriormente se realizó una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Los ácidos nucleicos de la fase superior fueron precipitados añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 4,5, e incubando a -20°C durante 30 min. Se centrifugó 15 min a 15.000 x g y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó y fue resuspendido en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgSO₄ 10 mM. La suspensión fue tratada con 100 unidades de DNasa I libre de RNasa y sometida a 2 extracciones con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y a otra con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Finalmente el RNA se precipitó 30 min a -20°C con 2,5 volúmenes de etanol y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 4,5. Se centrifugó 15 min, 15.000 x g, el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó y se resuspendió en 50 µl de TE.

Todo el material de vidrio así como las soluciones usadas para la extracción de RNA, se trataron a 37°C durante una noche con DEPC (dietil pirocarbonato) al 0,1% (v/v) para evitar la contaminación por RNasa.

2.5.6.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

La separación de RNA por tamaños se realizó como se describe en el apartado 2.5.5.3. pero usando una concentración de agarosa de 1-1,5% (p/v).

En aquellos casos en que se pretendía la transferencia del RNA a membranas de nylon los geles de agarosa se prepararon en condiciones desnaturizantes. En esta ocasión la agarosa se disolvió en tampón MOPS, compuesto por ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico 20 mM, acetato sódico 5 mM pH 7,0 y Na₂-EDTA 1 mM. Estos geles se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50°C aproximadamente y se les añadió formaldehído a una concentración final del 6,3% (v/v) y 1 µg/ml de bromuro de etidio. Los geles desnaturizantes, una vez finalizada la electroforesis, se sometieron a 3 lavados de 15 min con agua a 65°C para eliminar el formaldehído.

Antes de cargarlas en geles con formaldehído, las muestras hubieron de ser preparadas como sigue: a 6 µl de RNA se le añadieron 12,5 µl de formamida desionizada, 2,5 µl de tampón MOPS concentrado 10 veces y 4 µl de formaldehído al 37% (v/v). Esta mezcla se incubó 5 min a 65°C, se enfrió en hielo y se le añadieron 0,2 volúmenes de tampón de carga (apartado 2.5.5.3.).

En todos los casos, las electroforesis de RNA se llevaron a cabo en los mismos aparatos de electroforesis usados para DNA (ver apartado 2.5.5.3.) cuyos componentes se trataron previamente con H₂O₂ al 3% (v/v).

2.5.6.3. Determinación de la concentración de RNA en solución

Se siguió el mismo procedimiento espectrofotométrico que para DNA (ver apartado 2.5.5.6.) pero considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una disolución con 40 µg/ml de RNA.

2.5.7. Tratamiento enzimático de DNA

2.5.7.1. Restricción de DNA

Las enzimas de restricción utilizados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales Boehringer Mannheim y Pharmacia. Las reacciones se realizaron en las condiciones que recomiendan los fabricantes.

Los períodos de incubación oscilaron entre 2-12 h para restricciones de DNA plasmídico y 16-20 h para DNA genómico de cianobacterias.

Cuando fue necesario realizar restricciones dobles se procuró usar un tampón compatible con ambas. Si esto no era posible se realizaba primero la restricción con la enzima que requería una menor concentración de sales en el tampón, luego se llevaba la mezcla de reacción a un volumen mayor y se le añadían las sales necesarias para la restricción con la segunda enzima; o bien se realizaba la primera restricción en el tampón recomendado, se precipitaba el DNA en etanol absoluto, se secaba y resuspendía en TE y se realizaba la segunda reacción también en el tampón más adecuado.

2.5.7.2. Relleno de extremos protuberantes

Cuando se necesitó obtener extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes el DNA se trató con el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I de E. coli (Promega). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo el DNA en TE, 2 µl del tampón de reacción suministrado por el fabricante, 2 µl de una mezcla de nucleótidos de 2 mM cada uno, 1 unidad de enzima y agua hasta un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó 15 min a 37°C. Finalizada la reacción la enzima se inactivó calentado 15 min a 70°C y el DNA se usó directamente en las reacciones de ligación (apartado 2.5.7.3.)

2.5.7.3. Ligación

Para ligar dos fragmentos de DNA se usó la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Boehringer Mannheim). Las reacciones se desarrollaron en un volumen

de 10-15 µl durante 8-16 h a 16°C, utilizando el tampón suministrado por el fabricante. Cuando los fragmentos a ligar tenían extremos cohesivos se utilizó 1 unidad de enzima y cuando se trataba de extremos romos se utilizaron 5 unidades.

2.5.7.4. Marcaje radiactivo de sondas de DNA

Para el marcaje radiactivo de sondas de DNA se utilizó [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP siguiendo indistintamente dos métodos diferentes. El primero de ellos descrito por Rigby *et al.* (1977) se denomina de la "mella ambulante" (del inglés "nick translation") y se llevó a cabo utilizando los reactivos del denominado "Nick Translation Kit" (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del mismo. El segundo método se basa en la síntesis de fragmentos de DNA a partir de cebadores de deoxirribonucleótidos que se alinean al azar sobre un molde de DNA desnaturalizado (Feinberg y Volgelstein, 1983; 1984). En esta ocasión se utilizó el juego de reactivos denominado "Ready To Go" (Pharmacia) siguiendo también las instrucciones del fabricante.

En cualquiera de los dos casos las sondas marcadas radiactivamente se pasaron a través de columnas de Sephadex G-50 para eliminar los nucleótidos no incorporados. La radiactividad incorporada en el DNA se cuantificó con la ayuda de un contador de centelleo Beckman LS 2800.

2.5.8. Técnicas de hibridación

2.5.8.1. Transferencia de DNA de gel de agarosa a membranas de nylon

Los geles de agarosa con fragmentos de DNA separados por electroforesis se trataron durante 10 min en HCl 0,2 N y se lavaron con agua. Luego se llevó a cabo la transferencia del DNA en condiciones alcalinas (NaOH 0,4 N) a una membrana de nylon (Zeta-Probe de Bio-Rad o Hybond N⁺ de Amersham) por el método de capilaridad de Southern (1975) siguiendo el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989).

Una vez finalizada la transferencia la membrana se lavó durante 5 min a temperatura ambiente en una solución de SSC (NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,015 M, pH 7,0 ajustado con NaOH) concentrada 2 veces (2xSSC) y se dejó secar durante 30 min

a temperatura ambiente entre dos hojas de papel Whatman 3MM. Posteriormente el DNA se fijó calentando 1,5-2 h a 80°C.

2.5.8.2. Transferencia de DNA de fagos a filtros de nitrocelulosa

La transferencia de DNA de fagos desde calvas de lisis a membranas se hizo siguiendo el método de Benton y Davis (1977). Para ello las placas correspondientes con las calvas de lisis primero se mantuvieron varias horas a 4°C a fin de endurecer el agar y evitar el riesgo de que éste se adhiriese a la membrana. Posteriormente se colocaron membranas de nitrocelulosa (Nucleopore REC-85) sobre las mencionadas placas y se mantuvieron 1-2 min. Las membranas con los fagos se trataron 2 min cada vez y de manera sucesiva con tres soluciones distintas para lo cual, se colocaron con los fagos hacia arriba sobre tres hojas de papel Whatmann 3MM empapados en estas soluciones, que fueron:

- 1) Solución desnaturalizante de NaOH 0,2 M, NaCl 1,5 M
- 2) Solución neutralizante de Tris-HCl 0,4 M (pH 8,0), 2xSSC
- 3) 2xSSC

Seguidamente las membranas se dejaron secar durante 30 min a temperatura ambiente entre dos hojas de papel Whatmann 3MM y el DNA de los fagos se fijó a las mismas horneando 1,5-2 h a 80°C.

2.5.8.3. Transferencia de DNA de colonias a membranas de nitrocelulosa

Para buscar un determinado fragmento de DNA en una genoteca se utilizó el método de hibridación de colonias (Grunstein y Hogness, 1975) como viene descrito en Sambrook et al., 1989.

Las colonias de *E. coli* que se querían analizar se picaron por duplicado en placas de medio selectivo con y sin membrana de nitrocelulosa (Nucleopore REC-85). Ambos juegos de placas se incubaron durante 12 h a 37°C hasta que crecieron las células. Las placas con las picaduras inoculadas sin membrana se guardaron a 4°C para mantener la viabilidad de las células. Las réplicas en membrana se incubaron durante 12 h a 37°C sobre placas de medio LB con cloranfenicol a 200 µg/ml para amplificar los

plásmidos (Hanahan y Meselson, 1980; 1983). Seguidamente los filtros se depositaron sucesivamente durante 5 minutos sobre tres hojas de papel Whatmann 3MM saturadas con las siguientes soluciones:

- 1) SDS 10%
- 2) Solución desnaturalizante NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M
- 3) Solución neutralizante Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), NaCl 1,5 M
- 4) 2xSSC

Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min y se fijaron a 80°C durante 2 h. A continuación se lavaron durante 30 min a 55°C sumergiéndolas en 5xSSC, SDS 0,5%, Na₂-EDTA 1 mM (pH 8). Finalmente se rasparon suavemente con papel humedecido en la solución de lavado para eliminar los restos celulares.

2.5.8.4. *Transferencia de RNA a membranas de nylon*

El RNA separado en geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes se transfirió a membranas de nylon una vez eliminado el formaldehído del gel (ver 2.5.6.2.).

La transferencia se llevó a cabo sobre membranas de nylon (Hybond N⁺ de Amersham) y siguiendo el mismo método de capilaridad que para DNA (apartado 2.5.8.1.) pero la solución de transferencia usada fue 10xSSC.

Una vez finalizada la transferencia la membrana se lavó 5 min en 5xSSC y el RNA se fijó a la misma tratando con NaOH 0,4 M durante 2-5 min. Finalmente la membrana se envolvió en film transparente y se guardó a 4°C hasta su uso.

2.5.8.5. *Hibridación de fragmentos de DNA en condiciones restrictivas*

Los filtros de nylon con los fragmentos de DNA (apartado 2.5.8.1.) se prehibridaron durante un mínimo de 3 h a 65°C con agitación moderada en una solución conteniendo 5x SSC, fosfato sódico 25 mM, solución de Denhardt 5x, Na₂-EDTA 25 mM pH 8,0, 100 mg/ml de DNA de esperma de salmón degradado y desnaturalizado y SDS

al 0,5% (p/v). La solución de Denhardt 1x consta de 0,2 g/l de Ficoll tipo 400, 0,2 g/l de polivinilpirrolidona y 0,2 g/l de seroalbúmina bovina. La prehibridación se llevó a cabo en cubetas de vidrio con tapadera.

Transcurrido el período de prehibridación, la sonda se desnaturalizó hirviéndola durante 5 min y se añadió a las cubetas tras renovar el tampón de prehibridación. La hibridación se realizó a 65°C con agitación moderada durante 12-16 h. Posteriormente se procedió al lavado de los filtros en condiciones de alta restrictividad como sigue:

- 1) 5 min a temperatura ambiente en 2xSSC, SDS al 0,5% (p/v)
- 2) 15 min a temperatura ambiente en 2xSSC, SDS al 0,1% (p/v)
- 3) 30 min a temperatura ambiente en 0,1xSSC, SDS al 0,5% (p/v)
- 4) 1 h a 65°C en 0,1xSSC, SDS al 0,5% (p/v)

Las membranas se secaron entre hojas de papel Whatmann 3MM y se autorradiografiaron en películas Valca modelo HPX-44 o Kodak modelo X-OMAT a -80°C utilizando pantallas amplificadoras Valca modelo HPX o Dupont modelo Cronex Lightning Plus.

Si se pretendía usar la misma membrana para hibridaciones posteriores ésta se sometía a autorradiografía húmeda y envuelta en film transparente. Posteriormente se hervía 2 veces durante 45 min cada vez en una solución de 0,1xSSC, 0,5% SDS (p/v) para disociar la sonda radiactiva unida al filtro.

2.5.8.6 Hibridación in situ de placas de fagos e hibridación de colonias

Las membranas de nitrocelulosa con el DNA de fagos o de colonias (apartados 2.5.8.2. y 2.5.8.3.) se prehibridaron e hibridaron como se describe en el apartado anterior pero sin cambiar la solución de prehibridación antes de añadir la sonda. A continuación se efectuaron 4 lavados de 5 min en 2xSSC, 0,1% SDS (p/v) a temperatura ambiente y un lavado de 1 h en 1xSSC, 0,1% SDS (p/v) a 65°C. Posteriormente se dejaron secar al aire y se autorradiografiaron de la misma manera descrita en el apartado anterior.

2.5.8.7. Hibridación de fragmentos de RNA

Los filtros conteniendo RNA (apartado 2.5.8.4.) se prehibridaron e hibridaron de la forma descrita en el apartado 2.5.8.5. Tras la hibridación se lavaron 2 veces a temperatura ambiente y durante 10 min cada vez en 2xSSC, 0,1% SDS (p/v) y 15 min a 65°C en 1xSSC, 0,1% SDS (p/v). Posteriormente se envolvieron en film transparente a fin de evitar que se secasen y se sometieron a autorradiografía (apartado 2.5.8.5.).

Para eliminar la sonda radiactiva de los filtros y poder utilizarlos en hibridaciones posteriores se hirvieron 5 min en una solución de SDS al 0,5% (p/v).

2.5.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con objeto de aislar las ORFs denominadas sl10033, slr0088 y slr0940 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se llevaron a cabo amplificaciones de fragmentos de DNA portadores de las mismas utilizando la técnica denominada "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR descrita por Saiki *et al.* (1988). Esta técnica también se empleó para clonar la ORF B de *Synechocystis* en fase con el codón ATG del vector pTrc99A.

Esta técnica permite obtener grandes cantidades de un determinado fragmento de DNA a través de amplificación enzimática *in vitro*. Para ello se prepara una mezcla de reacción con el DNA molde (fragmento a amplificar), dos oligonucleótidos apropiados que servirán como cebadores para la síntesis, deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), una polimerasa de DNA termoestable (*Taq* polimerasa) y un tampón. Esta mezcla se somete a varios ciclos de distintas temperaturas que permiten desnaturalización, alineamiento y síntesis de un producto de secuencia y tamaño específicos.

En este caso se prepararon mezclas de reacción de 50 µl de volumen en tubos Eppendorf para PCR conteniendo:

1 ng de DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803

1 pmol de cada uno de los oligonucleótidos apropiados

5 µl de tampón de amplificación concentrado 10 veces
(Boehringer Mannheim)
0,2 mM de cada dNTP
0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Boehringer Mannheim)
H₂O hasta un volumen de 50 µl

A cada reacción se le añadieron 50 µl de aceite mineral para evitar pérdidas de volumen por evaporación. Los tubos así preparados se sometieron a las siguientes condiciones en un termobloque para PCR :

5 min a 95°C (desnaturalización)
30 ciclos de
 1 min a 95°C (desnaturalización)
 1 min a 50°C o 55°C (alineamiento
 DNA/cebadores)
 1 min a 72°C (extensión de cadenas de DNA)
10 min a 72°C (extensión de cadenas de DNA)

Finalmente se analizaron las distintas reacciones en un gel de agarosa al 0,6% (apartado 2.5.5.3.) y se purificaron las bandas de DNA de interés (apartado 2.5.5.4.).

Para amplificar la ORF denominada *sll0033* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores:

1) *sll0033R*

5'-AACAGAGAATTCACTGTTTCCCCTTCCTAC-3' que solapa con el comienzo del hipotético gen y contiene un sitio de restricción *Eco* RI (subrayado).

2) *sll0033F*

5'-AACAGAGGATCCTGACCGTACCCCCCAATG-3' que solapa con el extremo 3' del gen y contiene un sitio de corte para la enzima *Bam* HI (subrayado).

Para la ORF llamada *slr0088* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

1) slr0088F

5'-AACAGAGAAATTCATCACCACCGATGTTGTC-3' que contiene un sitio de restricción *Eco* RI (subrayado) y solapa con el comienzo de la región codificante.

2) slr0088R

5'-AACAGAGGATCCTTACCAAAAACGACGTTG-3' que contiene un sitio de restricción *Bam* HI (subrayado) y solapa con el extremo 3' de la región codificante.

En la amplificación de la ORF denominada slr0940 los oligonucleótidos utilizados fueron:

1) slr0940F

5'-AACAGAAATTCCGTGTTGCAATTGTGGGA-3' que solapa con el inicio del gen y contiene un sitio de restricción *Eco* RI (subrayado).

2) slr0940R

5'-AACAGAGGATCCTTACTGAGATGCCAGGAC-3' que contiene un sitio de corte para la enzima de restricción *Bam* HI y solapa con el extremo 3' del gen.

En la clonación de la ORF B de *Synechocystis* en pTrc99A se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

1) *lyc* 1

5'-CCATTTCCAACAAATTCCGTGAAGTGC-3' que solapa con el inicio de la ORF B y contiene una diana para la enzima *Mun* I (subrayado).

2) *lyc* 4

5'-CCCACCAGTAAACGCGCTTG-3' situado 401 pb "aguas abajo del codón ATG de la ORF.

2.5.10. Secuenciación de DNA

2.5.10.1. Obtención de deleciones seriadas mediante tratamiento con exonucleasa III

La obtención de deleciones seriadas del plásmido pBF3010 para secuenciación se llevaron a cabo mediante digestión con exonucleasa III (*Exo III*) de *E. coli*. Esta enzima es específica para DNA de doble cadena y digiere una de ellas comenzando por un extremo 5' protuberante (Henikoff, 1984). De esta forma se pueden realizar digestiones unidireccionales de plásmidos tratados con una enzima de restricción que genere extremos 3' protuberantes o romos y con una segunda que genere extremos 5' protuberantes, extremo a partir del cual se producirán las digestiones con la *Exo III*.

El DNA utilizado procedía de minipreparaciones de plásmidos (apartado 2.5.5.1.) que había sido purificado en una columna de Sephadex G-50. Este DNA se trató en primer lugar con la enzima que proporciona extremos resistentes frente a digestión con *Exo III* (*Bst XI* o *Apa I*) y luego con la enzima que proporciona extremos sensibles (*Bam HI* o *Eco RI*). Posteriormente se realizó el tratamiento con *Exo III* utilizando el juego de reactivos suministrado por Pharmacia (Suecia) denominado "double-stranded nested deletion kit" y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se extrajeron muestras a diferentes tiempos y los fragmentos obtenidos se trataron con nucleasa S1 para generar extremos romos. Una fracción de cada muestra se analizó electroforéticamente en geles de agarosa (apartado 2.5.5.3.) y la otra mitad se ligó con ligasa del fago T4 (apartado 2.5.7.3.) para recircularizar los plásmidos obtenidos. Tras la ligación se transformaron células de *E. coli* (apartado 2.5.2.2.) y se seleccionaron los clones apropiados.

2.5.10.2. Desnaturalización del DNA

Como molde para las reacciones de secuenciación se usaron 1-2 µg del DNA correspondiente procedente de minipreparaciones de plásmidos (apartado 2.5.5.1.). Este DNA se desnaturalizó durante 15 min a 37°C en presencia de NaOH 0,2 mM, Na₂-EDTA 0,2 mM pH 8,0. Con el fin de eliminar la solución de desnaturalización así como las impurezas de la muestra ésta se pasó a través de una columna de Sephadex G-50. El

DNA se precipitó con etanol absoluto y acetato sódico 3 M pH 5,2, se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó y se resuspendió en 7 µl de agua.

2.5.10.3. Reacciones de secuenciación

Para las reacciones de secuenciación se siguió el método de Sanger *et al.* (1977) basado en la terminación de la elongación de cadenas de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos.

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el juego de reactivos denominado "Sequenase Version 2.0" de United States Biochemical y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el marcaje radiactivo de las cadenas se utilizó [α - 35 S] dATP (1,212 mCi/mmol, New England Nuclear).

Los cebadores utilizados fueron los denominados universal -20 y el reverso suministrados por Boehringer Mannheim, que hibridan con el vector de clonación utilizado en regiones adyacentes al inserto de DNA que se desea secuenciar. Para realizar las reacciones de secuenciación que acompañan a las de extensión del cebador se utilizaron tres oligonucleótidos sintéticos:

5'-GCGATCACAACGCGCATGGG-3' *pds 1*

5'-TTTCGTAAGCTTCCTCAACAG-3' *pds 8*

5'-GTGGCAGGGGTGGGGACTTC-3' *lyc 5*

2.5.10.4. Resolución de secuencias de DNA en geles de poliacrilamida

Las secuencias de DNA se resolvieron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes como se describe en Sambrook *et al.* (1989).

Los geles se prepararon entre cristales con una separación de 0,4 mm. La composición de los geles fue: acrilamida:bis-acrilamida (19:1) al 6% (p/v) en tampón TBE (ver apartado 2.5.5.3.) y urea 7.M. Se polimerizaron con persulfato amónico al 0,8% (p/v) utilizando TEMED 6 mM como catalizador.

Antes de montar los geles los cristales se trataron con una solución de silano de diclorodimetilo (Merck) que facilitita la separación del gel del cristal una vez realizada la electroforesis.

Las muestras se calentaron 2 min a 80°C antes de cargarlas en los geles. Tras la electroforesis los geles se transfirieron a papeles Whatmann 3MM, se envolvieron en film transparente y se secaron al vacío y 80°C durante 2 h. Finalmente se autorradiografiaron a temperatura ambiente usando películas Valca modelo HPX-44 o Kodak modelo X-OMAT.

2.5.11. Reacciones de extensión del cebador

Utilizando RNA de cultivos de *Synechocystis* se llevaron a cabo reacciones de extensión del cebador (del inglés "primer extension") que sirvieron para mapear los extremos 5' de los genes *crtP*, *crtB* y *sll0147* (ORF B).

Los oligonucleótidos usados fueron los denominados *pds 1*, *pds 8* y *lyc 5* (apartado 2.5.10.3.).

2.5.11.1. Marcaje de los oligonucleótidos en el extremo 5'

Los oligonucleótidos que sirvieron como cebadores para la síntesis de DNA a partir de RNA se marcaron en el extremo 5' utilizando [γ -³²P]-dATP y polinucleótido kinasa del fago T4 (Boehringer Mannheim). Para el marcaje se preparó una mezcla de reacción conteniendo: 100 pmol de oligonucleótido, Tris-HCl 40 mM pH 8,0, MgCl₂ 8 mM, DTT 4 mM, 3 μ l de [γ -³²P]-dATP (3000 Ci/mmol) y 9 unidades de polinucleótido kinasa de T4. Esta mezcla se incubó 30 min a 37°C y la enzima se inactivó calentando 10 min a 70°C.

Los oligonucleótidos marcados se sometieron a extracción con 1 volumen de fenol y 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). La fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2. Tras centrifugar 15 min a 4°C y 15000 x g, el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó y se resuspendió en 10 μ l de agua.

2.5.11.2. Hibridación del oligonucleótido con el molde de RNA

Para realizar la hibridación del oligonucleótido con el molde de RNA se mezclaron 3 µl de oligonucleótido marcado, 9,25 µl de de RNA de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (10-20 ng), 1,65 µl de KCl 2 M y 1,3 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8,3. Esta mezcla se desnaturalizó durante 3 min a 80°C y se incubó 1 h a la temperatura de hibridación. Las temperaturas de hibridación se estimaron restando 5°C a la temperatura de fusión (T_m) del oligonucleótido.

2.5.11.3. Copia del RNA por la transcriptasa reversa

Se hizo una copia en DNA del RNA de *Synechocistis* utilizando la transcriptasa reversa M-MLV suministrada por Promega. En esta ocasión se mezclaron 3 µl de híbrido oligonucleótido/RNA con 5 µl de tampón de retrotranscripción concentrado 2 veces (Tris-HCl 24 mM pH 8,3, MgCl₂ 16 mM, dNTPs 4mM de cada uno y 0,1 mg/ml de actinomicina D), 1 µl de transcriptasa reversa (9 unidades) y 1 µl de agua. La reacción se desarrolló durante 45 min a 50°C. La reacción se paró adicionando 0,5 ml de Na₂-EDTA 0,5 m pH 8,0. Seguidamente se añadió 1 ml de RNasa pancreática (1 mg/ml) y se incubó durante 15 min a 37°C. A continuación se realizó una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y otras dos con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Finalmente la fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se centrifugó 15 min a 15.000 x g y 4°C. El precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75% (v/v), se secó , se resuspendió en 5-10 µl de TE a los que se añadieron 2 µl de tampón de carga con formamida.

2.5.11.4. Análisis de los productos de la reacción en gel de poliacrilamida

Los productos de extensión del cebador se analizaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes como se describe en el apartado 2.5.10.3. Los marcadores de tamaño usados fueron reacciones de secuenciación realizadas con los mismos oligonucleótidos (sin marcar radiactivamente) como cebadores de la síntesis y con el molde de DNA apropiado (ver apartado 2.5.10.2.).

El gel una vez seco se autorradiografió a -80°C en películas Valca modelo HPX-44 o Kodak modelo X-OMAT usando pantallas amplificadoras Valca modelo HPX o Dupont modelo Cronex Lightning Plus.

2.6. METODOS ANALITICOS

2.6.1. Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separaron según su tamaño en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes siguiendo el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970).

Se preparó un gel separador con acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida, 29:1) al 10% (p/v) y SDS al 0,1%(p/v) en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, y uno de empaquetamiento con la misma mezcla de acrilamida al 4%(p/v) y SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,125 M pH 6,8. Para polimerizar los geles se añadió persulfato amónico al 0,05% y TEMED a una concentración final de 6 mM.

Los precipitados celulares (apartado 2.1.2.2.) se lisaron resuspendiendo directamente en 200 μl de tampón de carga compuesto por SDS al 1% (p/v), glicerol al 10% (v/v), 2-mercaptoetanol al 1% (v/v), Tris-HCl 60 mM pH 7,2 y azul de bromofenol al 0,01% (p/v). Como marcadores de peso molecular se utilizaron las proteínas suministradas por Bio-Rad: fosforilasa *b* de músculo de conejo (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31,0 kDa), inhibidor del tripsinógeno de soja (21,5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14,4 kDa).

La electroforesis se desarrolló en aparatos Mini-Protean II (Bio-Rad) a voltaje constante (200 v). Como tampón de electroforesis se usó una solución de Tris-HCl 25 mM, glicina 0,32 M pH 8,3 y SDS al 0,1% (p/v).

Tras la separación de las diferentes proteínas éstas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 min. Seguidamente los geles se lavaron con agua y se fijaron en una

solución conteniendo metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Una vez fijados, los geles se mantuvieron cubiertos con agua hasta que se fotografiaron utilizando una videocámara ImageStore 5000 (UVP).

2.6.2. Determinación de carotenoides totales

Los carotenos presentes en un cultivo se extrajeron siguiendo el método de Davies (1976). Las células correspondientes a 10-50 ml de cultivo se liofilizaron y se estimó el peso seco pesando en una balanza de precisión. 20-30 mg de esta biomasa se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se añadieron 20 ml de metanol y 6 ml de KOH al 60% (p/v) y se calentó a 65°C durante 20 min para saponificar las clorofilas. Posteriormente los carotenoides se extrajeron con éter dietílico al 10% (v/v) en éter de petróleo (35-80°C). La fase orgánica se evaporó con N₂ líquido y los pigmentos se resuspendieron en metanol. Se midió la absorbancia a 445 nm de esta preparación y se estimó la concentración de carotenoides coloreados usando un coeficiente de extinción de 250 (mg/ml)⁻¹ cm⁻¹.

2.6.3. Separación y análisis de carotenoides por HPLC

La separación y análisis de los distintos carotenoides presentes en una determinada muestra se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Los carotenoides se extrajeron como se describe en el apartado anterior. Se resuspendieron en 100 µl de metanol o de acetona de los cuales 20 se inyectaron en el cromatógrafo. La separación se hizo a través de una columna Nucleosil-C₁₈ de 3 µm o Spherisob ODS-1 de 5 µm, usando una mezcla de acetonitrilo:metanol:2-propanol 85:10:5 (v/v/v) como eluyente.

Un detector con batería de diodos (Waters 994) y un detector de radiactividad (Ramona Ls, Ray test, Straubenhardt, Germany) conectados al sistema de HPLC permitieron obtener los espectros de absorción de los picos de elución e identificar productos marcados radiactivamente. Los diferentes pigmentos se identificaron comparando sus tiempos de elución así como sus espectros de absorción con los de patrones purificados.

2.6.4. Determinación de clorofila

La concentración de clorofila presente en los distintos cultivos cianobacterianos se estimó por espectrofotometría tras realizar una extracción con metanol (McKinney, 1941). Se recogieron las células de 1 ml de cultivo centrifugando 5 min a $15.000 \times g$ y se resuspendieron en 1 ml de metanol absoluto. Esta suspensión se agitó vigorosamente durante 1 min y se volvió a centrifugar de la misma manera. Para determinar la concentración de clorofila se midió la absorbancia del sobrenadante a 665 nm y se utilizó el valor $74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción.

2.6.5. Determinación de proteína

El contenido de proteína presente en suspensiones celulares se estimó siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) modificado por Markwel *et al.* (1978). Para ello las muestras se llevaron a un volumen de 0,2 ml con agua, se añadieron 50 μl de NaOH 0,5 N y 0,75 ml de una mezcla de las soluciones A y B en proporción 100:1 (v/v). La solución A está formada por: CO_3Na_2 2%, NaOH 0,4%, tartrato sódico potásico 0,16%, SDS 1% (p/v). La solución B consta de : $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%. Después de incubar durante 15 min a 30°C se añadieron 75 μl de reactivo Folin-Ciocalteu (Merck) diluido 2 veces en agua y se incubó otros 30 min a 30°C . Posteriormente se midió la absorbancia a 660 nm. Para cada determinación se realizó una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

En el caso de extractos libres de células la determinación de proteína se calculó siguiendo el método descrito por Bradford (1976). La muestra conteniendo entre 0 y 25 mg de proteína se llevó hasta un volumen de 0,8 ml con agua y se añadieron 0,2 ml de reactivo para determinación de proteínas (Bio-Rad). La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. Para cada determinación se realizó una recta patrón con cantidades conocidas de ovoalbúmina.

2.6.6. Medida de pH

Para medir el pH de las disoluciones preparadas en este trabajo se utilizó un pH-metro Crison.

2.6.7. Medidas espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia de luz visible o ultravioleta se hicieron en un espectrofotómetro marca Hitachi.

Los espectros de células completas se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS SLM AMINCO DW-2000 (SLM Instruments, Inc.)

2.6.8. Medida de la intensidad de iluminación

En este trabajo se ha denominado "intensidad luminosa" a la densidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) expresada en $\mu\text{einsteins m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se ha determinado con un medidor-integrador LI-COR Inc., provisto de una célula sensora LI-188B.

2.6.9. Determinación de oxígeno en solución

Cuando fue necesario estimar la actividad fotosintética de cultivos de *Synechocystis*, se determinó el desprendimiento de oxígeno dependiente de HNaCO_3 con un electrodo de oxígeno Hansatech DW. Para ello se colocaron 2 ml de suspensión celular con una concentración de clorofila de $5 \mu\text{g/ml}$ en la cubeta del electrodo y se añadieron $50 \mu\text{l}$ de HNaCO_3 500 mM. La muestra se mantuvo inicialmente en oscuridad durante algunos minutos para determinar la tasa de fotorrespiración y luego se iluminó lateralmente con luz blanca procedente de un proyector de diapositivas para estimular la liberación de oxígeno. El ensayo se realizó a 25°C y con agitación continua. Para el calibrado del electrodo se consideró un coeficiente de solubilidad del oxígeno en agua a 25°C de 0,56.

2.7. ANALISIS DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEINA POR METODOS INFORMATICOS

La búsqueda de fases de lectura abierta, los análisis de restricción y la traducción de DNA a proteína se realizó utilizando el programa DNA Strider Version

1.2 diseñado por Christian Mark (Service de Biochemie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Francia).

A través de la conexión con el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA) se utilizó el paquete informático del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin (USA) (Devereaux *et al.*, 1984) y se accedió al banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania). La búsqueda en la base EMBL de secuencias similares a las obtenidas en este trabajo se realizó mediante la aplicación FASTA (Pearson y Lipman, 1988) contenida en el paquete GCG.

Los árboles filogenéticos se realizaron utilizando el procedimiento llamado "neighbour joining" del paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989) después de que las secuencias fuesen alineadas con el programa ClustalW (Thomson *et al.*, 1994). Las secuencias fueron remuestreadas 100 veces.

3. RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO DE UNA MUTACION DE RESISTENCIA A NICOTINA Y MPTA EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

Uno de los procedimientos para clonar genes implicados en carotenogénesis consiste en el aislamiento de mutantes resistentes a herbicidas que inhiben específicamente a una enzima de la ruta. Como se describe en la introducción, este sistema ha servido para clonar los genes *crtP* y *crtL* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Chamovitz *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1993) así como el *crtP* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Martínez-Férez y Vioque, 1992).

En este trabajo se ha clonado una ORF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con una mutación que confiere resistencia a los herbicidas MPTA [2-(4-metilfenoxi) trietilamina hidrocloreuro] y nicotina descritos como inhibidores específicos de la ciclase del licopeno en plantas, cianobacterias y algas (Sandmann y Böger, 1989). La mutación se ha aislado a partir del mutante espontáneo MPTA1 de *Synechocystis* resistente a MPTA y nicotina. Este mutante crece en presencia de 40 μM de MPTA o 0,5 mM de nicotina, concentraciones de inhibidores a los que la estirpe silvestre no crece.

3.1.1. Clonación de la mutación de resistencia a MPTA y nicotina de MPTA1

En primer lugar se comprobó que el DNA genómico extraído del mutante MPTA1 transformaba con alta eficiencia a la estirpe silvestre confiriéndole resistencia a nicotina, inhibidor utilizado a lo largo de este trabajo. Así pues, parecía posible aislar un fragmento de DNA que contuviera la mutación de resistencia por su capacidad de transformar a la estirpe silvestre en resistente al herbicida.

El proceso de aislamiento de la mutación de resistencia a nicotina se muestra en la figura 3 y se detalla a continuación. El DNA de la estirpe MPTA1 se digirió con la enzima *Eco* RI y se separó electroforéticamente en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (apartados 2.5.7.1. y 2.5.1.3.). El carril del gel con el DNA digerido se cortó en 62 fracciones de 1-2 mm cada una. Para determinar en qué fracción se encontraba el fragmento de DNA portador de la mutación se transformaron células de la estirpe silvestre con el DNA de cada una de las fracciones por el "método de las gotas" (Dzelzkalns y Bogorad, 1988) que consiste en depositar gotas de DNA sobre células de *Synechocystis* sembradas en césped en placas de medio BG11 suplementado con nicotina.

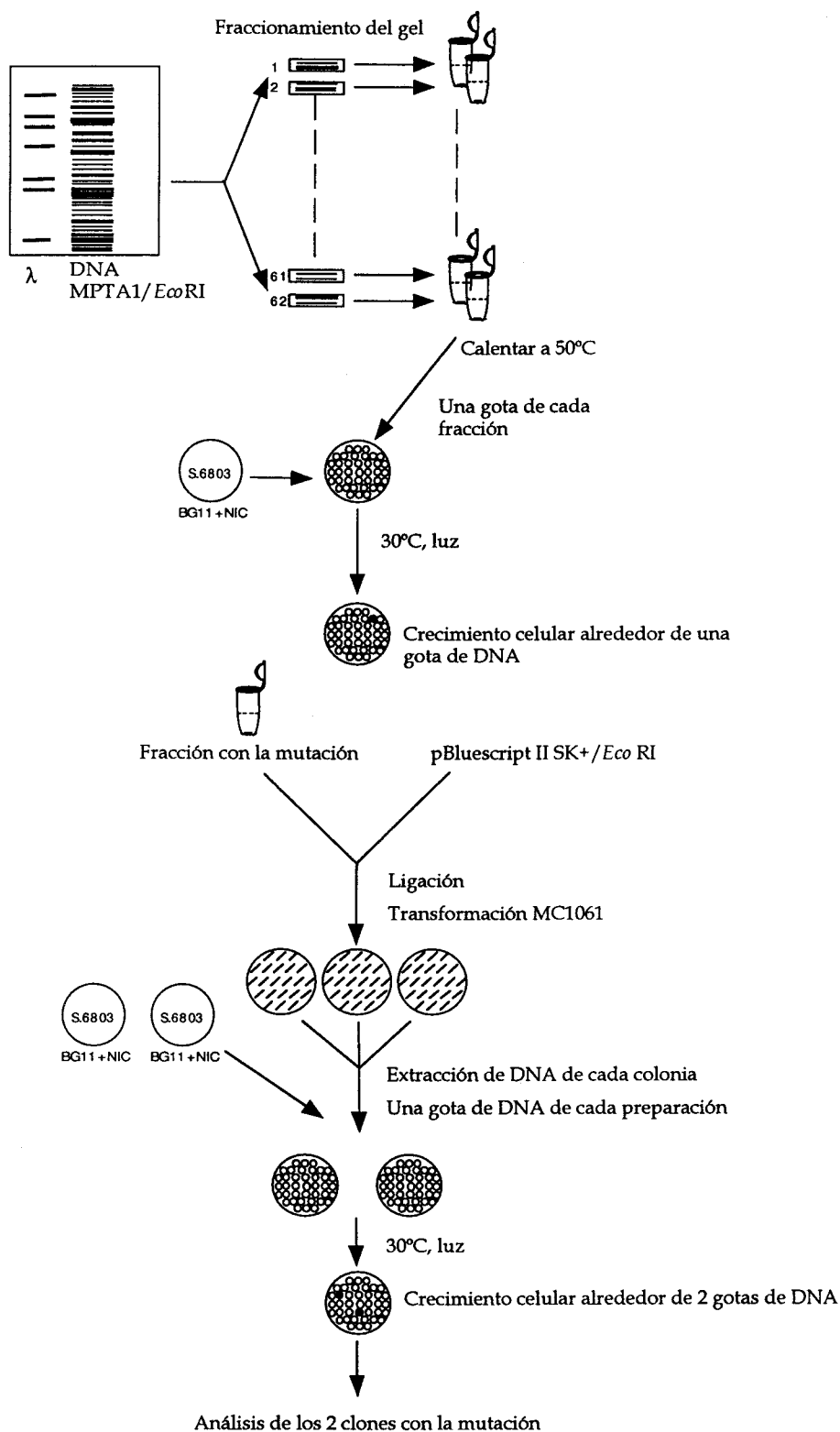


Figura 3. Esquematación del proceso de aislamiento de la mutación de resistencia a nicotina en el mutante MPTA1.

Se prepararon 2 placas con nicotina 0,5 mM y se depositaron gotas de 5 μ l de las fracciones del gel, previamente fundidas a 50°C, sobre las células. Después de 15 días de incubación en luz a 30°C aparecieron colonias resistentes a nicotina alrededor de una de las gotas de DNA correspondiente a un fragmento de DNA de un tamaño aproximado de 6-7 kb, lo que indicaba que la fracción correspondiente portaba el fragmento de DNA con la mutación de resistencia. El DNA de la fracción adecuada se purificó de la agarosa y se ligó al vector pBluescriptII SK+ cortado con *Eco* RI (apartado 2.5.7.) para construir una genoteca parcial. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E.coli* MC1061 (apartado 2.5.2.2.). De esta transformación se obtuvieron 198 colonias resistentes a ampicilina (marcador de resistencia del vector de clonación). Se extrajo DNA plasmídico a partir de cultivos de cada una de estas colonias (apartado 2.5.5.1.) y se utilizó para transformar células de la estirpe silvestre de *Synechocystis* por el "método de las gotas" descrito anteriormente (Dzelzkalns y Bogorad, 1988) seleccionándose los transformantes en presencia de nicotina. De esta forma se aislaron dos clones con la mutación de resistencia. Los análisis de restricción de los clones positivos indicaron que ambos eran idénticos y portaban un inserto de 6,6 kb. Se seleccionó uno de los clones al que se denominó pBF100. Su mapa de restricción se muestra en la figura 4.

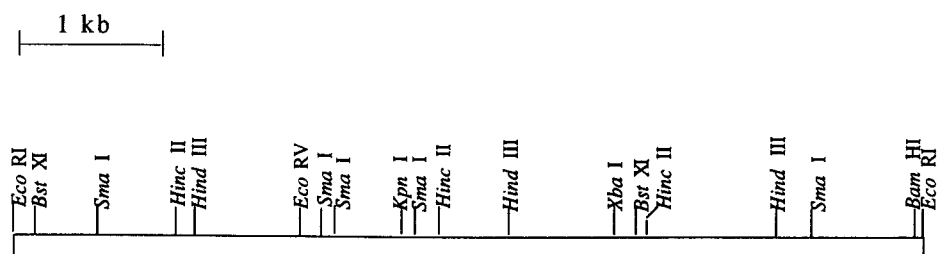


Figura 4. Mapa de restricción del inserto de DNA del plásmido pBF100.

3.1.2. Localización de la mutación dentro del clon pBF100

Con el fin de localizar la mutación de resistencia a nicotina dentro de pBF100 se realizaron subclones del mismo y se probó su capacidad para transformar a *Synechocystis* sp. PCC 6803 en resistente a nicotina.

Mediante restricción *Xba* I de pBF100 seguida de autoligación (apartado 2.5.7.) se generó el plásmido pBF102 en el que el fragmento de 2,2 kb *Xba* I se ha deleciónado (figura 5). De la misma manera, por restricción de pBF100 con *Eco* RV seguida de autoligación se generaría el plásmido pBF103 en el que el fragmento *Eco* RV de 2,1 kb se ha deleciónado (figura 5).

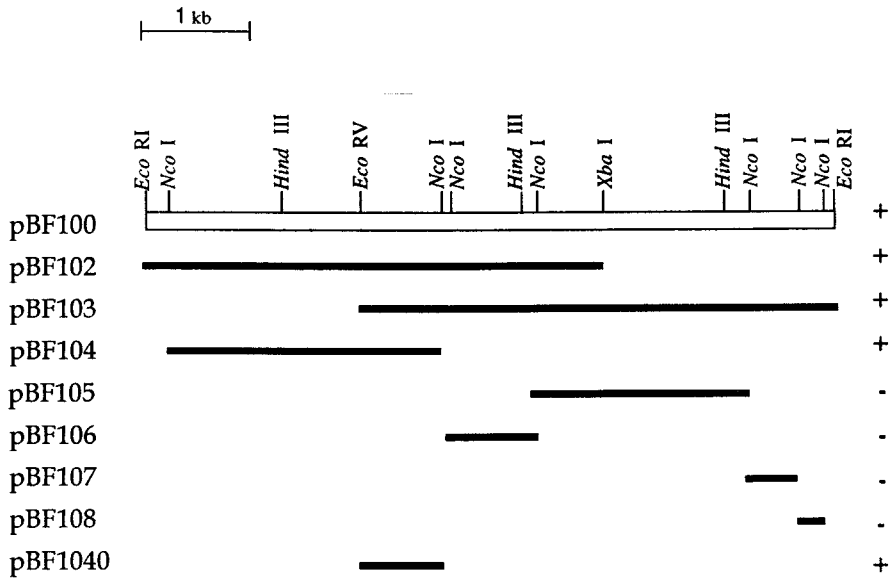


Figura 5. Localización de la mutación de resistencia a nicotina del mutante MPTA1 contenida en el inserto del plásmido pBF100.

En la figura se muestran los mapas de restricción de los insertos de los plásmidos pBF102-108 y de pBF1040. Los signos + ó - situados al lado de cada fragmento indican si dicho fragmento transformaba (+) o no (-) a la estirpe silvestre de *Synechocystis* en resistente a nicotina.

Paralelamente se realizaron otras subclonaciones para lo que se digirió el plásmido pBF100 con la enzima *Nco* I de manera que se obtuvieron 5 fragmentos correspondientes al inserto de 2,4, 2,1 0,98, 0,39 y 0,35 kb. Estos fragmentos se trataron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se clonaron en el punto *Eco* RV del sitio de clonación múltiple de pBluescriptII SK+ (apartado 2.5.7.). Se obtuvieron los plásmidos pBF104, pBF105, pBF106, pBF107 y pBF108 (figura 5).

Se realizó una transformación de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con los plásmidos

pBF102-pBF108 y se seleccionaron los transformantes en medio suplementado con nicotina (apartado 2.5.2.1.). Se obtuvieron colonias resistentes al herbicida con los clones pBF102, pBF103 y pBF104. De esta manera se determinó que la mutación se debía localizar en el fragmento de 650 pb *Nco* I/*Eco* RV común entre los tres plásmidos. Finalmente, por restricción de pBF104 con las enzimas *Cla* I y *Eco* RV, posterior tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y autoligación (apartado 2.5.7.) se generó el plásmido pBF1040 cuyo inserto se corresponde con el fragmento de 650 pb en el que se había localizado la mutación (figura 5). Mediante transformación de *Synechocystis* con pBF1040 se verificó la presencia de la mutación de resistencia en este fragmento de DNA.

3.1.3. Clonación y secuenciación de la región de DNA silvestre en la que se localiza la mutación de resistencia a nicotina

3.1.3.1. Clonación de la región silvestre

El fenotipo del mutante MPTA1, resistente a herbicidas cuya diana es la enzima ciclasa del licopeno, hacía pensar que la mutación del mismo estuviera afectando al gen de esa enzima. Por tal motivo se decidió clonar y analizar la región silvestre en la que se sitúa la mutación.

Se construyó una genoteca parcial en el vector pBluescriptII SK+ con fragmentos de DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 digerido con *Eco* RI y de tamaños comprendidos entre 6 y 7 kb (apartado 2.5.7.). Se analizaron por hibridación 400 colonias de esta genoteca usando como sonda un fragmento *Eco* RV de 2,1 kb de pBF100 (apartado 2.5.8.). Se obtuvieron 4 clones que hibridaban con la sonda. El análisis de restricción permitió identificar 2 de ellos con insertos idénticos al de pBF100 y orientados de la misma manera. Se seleccionó uno de ellos y se le denominó pBF300.

3.1.3.2. Secuenciación de la región silvestre

Como ya se ha dicho anteriormente, era probable que la mutación de MPTA1 se localizase dentro del gen de la ciclasa del licopeno de *Synechocystis* por lo que se procedió a la secuenciación de la región de DNA portadora de la mutación y de sus alrededores en busca de una ORF candidata.

Se subclonó un fragmento *Hind* III de 2,2 kb de pBF300 que incluía la región de la mutación en el vector pBluescriptII SK+/*Hind* III generándose el plásmido pBF3010 (apartado 2.5.7.). Se realizaron delecciones seriadas del inserto de pBF3010 (apartado 2.5.10.1.) y se secuenciaron siguiendo el método de terminación de cadenas de DNA por incorporación de dideoxynucleótidos (apartado 2.5.10.). La estrategia de secuenciación se muestra en la figura 6.

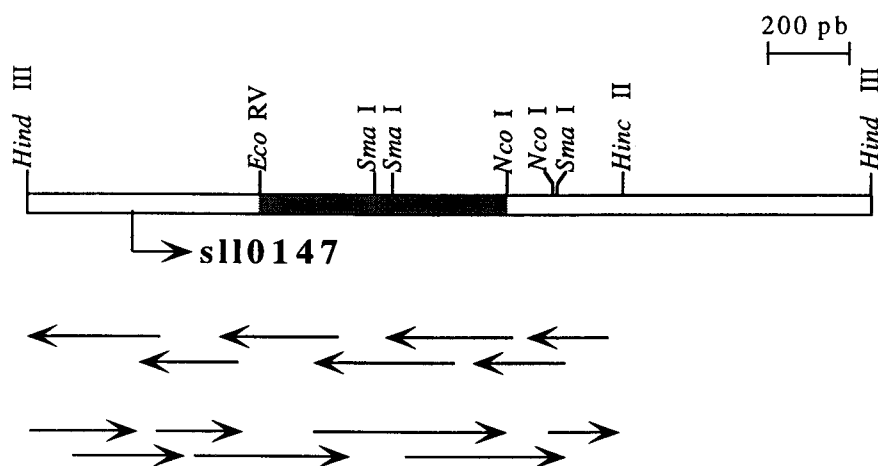


Figura 6. Estrategia de secuenciación del fragmento de DNA de la estirpe silvestre de *Synechocystis* correspondiente a la zona donde se localiza la mutación de resistencia a nicotina.

Se muestra la región de 1523 pb secuenciada. Las flechas indican los fragmentos de secuenciación leídos de cada clon utilizado. Se indica asimismo el inicio de la ORF sll0147. La región donde se ha mapeado la mutación aparece sombreada.

Se secuenciaron un total de 1523 nucleótidos. Al estudiar la secuencia se encontró que este fragmento portaba parte de una fase de lectura abierta, el equivalente a 389 aminoácidos. A esta ORF se le llamó ORF B. El análisis de secuencia (apartado 2.7.) mostró que correspondía a un fragmento de una ORF de función desconocida localizada en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esta ORF se denomina sll0147 y su tamaño total es de 667 aminoácidos (figura 7).

-35 -10

TACTCAACCAGTTGCCCATTTGGTTGATACCATAAATACAAGCCAGATACATTTTGCTTTT 60

TTCTTACACATTTTTTGTGCTTTGGCAATCCGCCGGCCACGACTTTTAAGTCCATTTCCA +1	120
ACCCATGCGTGAAGTCTACTGTGAAGTCCCCACCCCTGCCACCGCTGAAGTTGTCCG M R E L L Y C E V P T P A T A E V V A	180 19
TTGGCTTCAGGAAATTTGGTCGCCCTTAGTGGGGCAAAGTTGCCACGGAGCAAGTTT W L Q G N W S P L V G Q K L P T E Q G L	240 39
ACGGTTGCGGGTTCCTCCGGCCAAAGCAGTGAAGTATCCATTTTTTGTGTGGTCTCTACA R L R G S S G Q S S E L S I F V W S L Q	300 59
AAGAACTACCTATCTTAAGTGTGTGCGTTGGGGTGACACTAGCTTCCCCCAAGAAACGGC R T T Y L K C V R W G D T S F P Q E T A	360 79
GATCGCCAAGGAATTAAGCGGGCATTAGGGCAAAAATTTCTCCACCTATCCGGTCCC I A K E L R R A L G Q K F P P T Y P V P	420 99
ACGGCGATCGATCTGGATCGGCAAAATATTTCCAGGCGTTACAAGATCGATATCCTGA P A I D L D R Q N I F Q A L Q D R Y P E	480 119
AACGGTTAAATTTCTTCCAAAAATTTCCCAAGGAGAATATGACCTCAAGCGGTTTACTG T V K F F Q K F P Q G E Y D L K R V Y W	540 139
GTGGAACAACGGTGGCGGGACAATGTAGCGAATCCCCAAACCCCTAGGCAGGTGGTCAG W E Q R W R D N V A N P Q T P R Q V V S	600 159
TCAAACCTCCACGGTAACGGCGATCGCCCCTGCAACCCCTGAGTTTGACCTAATTTACCT Q T S T V T A I A P A T P E F D L I Y L	660 179
GGCGGGGCTCTGGGTTGAGTCCATGCGGCGGTGATGGCCCGGTTGGGTTATCGGGTACT <u>G G A L G S V H A A V M A R L G Y R V L</u>	720 199
G	
GCTCATTGAACGATTGCCCTTCGGCCGAATGAATCGGGAATGGAATATTTCCCGGGATGA <u>L I E R L P F G R M</u> N R E W N I S R D E	780 219
V	
ATTTACAGCGGTTAATTTGACTTAAATTTATTCACCCAGAGGAATTTGAAAGCGTCATTGC F Q R L I D L N L F T P E E F E S V I A	840 239
CCGGAATATCGAGACGGGTTTAAATAAGTTTTTTGATGCCTATAATCCGCCCATCTTAA R E Y R D G F N K F F D A Y N P P H L K	900 259
AGCTAATGTGCTCCACACTCCCACTGTATTAACATTTGCCCTAGATTCGGCTAAATTTCTT A N V L H T P T V L N I A L D S A K F L	960 279
GGCTATCTGTGGACATAAACTCCAGCAAGCAGGGGGAATTTATTTGGGATGAACTGAATTT A I C G H K L Q Q A G G I I W D E T E F	1020 299
TATTAACGCCACTATTGATCCGAACAAAGTGGTAGTCCATTGCATTAATTTGGAAAATAA I N A T I D P N K V V V H C I N L E N N	1080 319
TCAAACAAAATTAGCCCAAGCCAGATTTGTTAGTAGATGCCATGGGTACCGCTTCTCCCAT Q T K L A Q A R L L V D A M G T A S P I	1140 339
TGCTTGGCAATTAATGGCGGTAAAATTTTTAACAGTGTTTGTCCCACGGTGGGGCCGTT A W Q L N G G K T F N S V C P T V G A V	1200 359
GGTGAAGGCCTAGATCCGGTGGTTTGGGATAATGCTTATGGTGTGTGCTCAATTTCCA V E G L D P V V W D N A Y G D V L N S H	1260 379

TGGAGATATTTCCCGGGTAGGCAGTTAATTTGGGAATTGTTCCTCCCGAGCAGGGGACGA	1320
G D I S R G R Q L I W E L F P G A G D E	399
AATGACCATTATCTTTTCCATTACCATCAAGTTAATCGGGAAAATCCTGGTCTTTTGT	1380
M T I Y L F H Y H Q V N R E N P G S L L	419
GGAAATGTACGAAGACTTTTTCAGCATTTTGCCGGAGTATCGTTCGCTGTAATCTGGAAAA	1440
E M Y E D F F S I L P E Y R R C N L E K	439
GTAACTTGGAAAAAGCTACCTTCGGTTATATTCTGGTCACTTTAGCACCAGCGCCCA	1500
L T W K K A T F G Y I P G H F S T S A Q	459
AGACCGTACCATTGCCCTAGACCGATTAATGGCGATCGGGGATGCCGCTTCTCTCCAATC	1560
D R T I A L D R L M A I G D A A S L Q S	479
TCCTTTGGTGTTCACCTGGGTTTGGCTCTCTAGTACGGAACTTAGCCAAATTAACGGACTT	1620
P L V F T G F G S L V R N L A K L T D L	499
GTTGCACACAGCTTTGCAGTATGACCTGCTCCAAGCAAAGCAATTAATCAAATTCGGGC	1680
L H T A L Q Y D L L Q A K Q L N Q I R A	519
CTACCAAAGTAATATGTCTGTGACTTGGATGTTTTCCAAGGGAATGATGGTGGCGACGGG	1740
Y Q S N I A V T W M F S K G M M V P T G	539
GAAACAATGCCGCCCAACAGGTTAATGCCATGCTCAATACTTTCTTTGGTCTATTGGC	1800
K Q L P P Q Q V N A M L N T F F G L L A	559
AGACTCGGCCCAACGGTGGCGGAAACTTTCATTAAAGACCGCACTACTTGGCTATTATT	1860
D S A P T V A E T F I K D R T T W L L F	579
TTCTCGCTTAGCTCTTAAGGCTGCTAGCAAAAATCCCCAACTATTGTTTTGGATTGGCA	1920
S R L A L K A A S K N P Q L L F W I W Q	599
GATGGCTGGCACCGAGGATCTACTAAAATGGCTGTTAGTTTATTTTGATTTTTCCCGTCA	1980
M A G T E D L L K W L L V Y F D F S R Q	619
AGCTTTACTCAATGCCCTATTCCGCTTTTGGTATCCCCAGTGGCTAATTAATTCCCGCAA	2040
A L L N A L F R F W Y P Q W L I N S R N	639
TTGGTTGGAAAAGCTTTCTCCCCAACTATGGTTTTCTTTGTTGTGTTTCGGTTATCAAAT	2100
W L E K L S P Q L W F S L L C F G Y Q I	659
TCAACCAAAATTAGCTCAACAATCCAAGTAAATTAGGGCGACATTAAGAAAAAATATTT	2160
Q P K L A Q Q S K *	668
GCTCCGGCACATTCACCAATGCAAACATTGCTGTTAATCTG	2201

Figura 7. Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de *Synechocystis* correspondiente a la fase de lectura abierta ORF B donde se localiza la mutación de resistencia a nicotina y MPTA.

Bajo la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la ORF B. En la secuencia se subraya un motivo de unión a nucleótidos y se indica la mutación de resistencia (A749G). Esta mutación produce la sustitución de metionina por valina en la posición 209 de la proteína (apartado 3.3.). El sitio de inicio de la transcripción (+1) así como posibles cajas -35 y -10 están indicados.

3.2. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE sII0147 (ORF B)

ORF B contiene un motivo de unión a nucleótido similar a la que se encuentra en enzimas dependientes de NAD(P) o FAD (figura 8). Este motivo también se ha identificado en la licopeno ciclasa de *Synechococcus* y plantas superiores, sin embargo en el caso de ORF B la secuencia de unión a nucleótidos está situada entre las posiciones 179 y 209. Normalmente esta secuencia se encuentra próxima al extremo amino terminal de la proteína.

NADP	G-G--A---A-----G-----R-----R	
NAD	G-G--G---G-----G-----E-----B	(B=P, A, S ó G)
FAD	A A S	(s=A, I, L, V, M ó C; a=D ó E)
	GGG-GGs--s--s-----s-ssa-----	
ORF B (silvestre)	179 LGGALGSVHAAVMARLGYRVLLIERLPFGRM	209
ORF B (MPTA1)	179 LGGALGSVHAAVMARLGYRVLLIERLPFGRV	209
<i>Synechococcus</i> 7942 <i>crtL</i>	7 GSGPAGLAIAAELAQRGLKVQGLSPVDPFHP	37

Figura 8. Comparación del motivo de unión a nucleótidos con la secuencia de ORFB y de la licopeno ciclasa de *Synechococcus* 7942.

Se indican en negrita aquellos aminoácidos que concuerdan con el consenso establecido para NADP, NAD o FAD.

La mutación de resistencia se encuentra precisamente al final de este motivo y consiste en la sustitución de la metionina 209 por valina (apartado 3.3.). Se ha comparado ORF B con las bases de datos y especialmente con las licopeno ciclasas caracterizadas hasta ahora sin que se haya detectado ninguna homología significativa. Es de resaltar que además de la carencia de homología con otras licopeno ciclasas, tampoco contiene los motivos que se han identificado recientemente como implicados en la unión de nicotina en estas enzimas (Bouvier *et al.*, 1997).

3.3. IDENTIFICACION DE LA MUTACION DE MPTA1

Con objeto de localizar la posición exacta en la que se encontraba la mutación de MPTA1 se secuenció el fragmento de 650 pb de pBF3040 portador de la mutación

(apartado 2.5.10.). De esta forma se determinó que la mutación era puntual y consistía en la sustitución de un nucleótido, concretamente de una transición de A a G (figura 9). Este cambio supone en la proteína el cambio de metionina a valina en la posición 209.

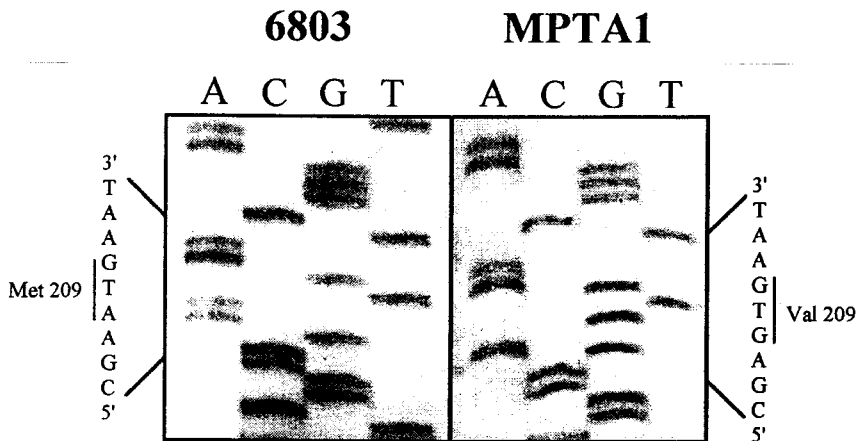


Figura 9. Identificación de la mutación de resistencia a nicotina del mutante MPTA1.

Autorradiografía de un gel de secuenciación que muestra la mutación encontrada en la ORF sll0147 de *Synechocystis* que confiere resistencia a nicotina.

La posición mutada afectaría a la secuencia de unión a nucleótidos que se puede identificar en ORF B.

3.4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE MPTA1

Se evaluó la resistencia a nicotina y MPTA del mutante MPTA1 mediante la determinación de la inhibición *in vivo* (I_{50}) (apartado 2.3.) de la biosíntesis de carotenoides en células intactas (tabla 3).

Los valores de las I_{50} estimados para MPTA1 son mayores con ambos herbicidas indicando que esta estirpe experimenta una menor inhibición *in vivo* de la síntesis de carotenoides que la silvestre. Se pone pues de manifiesto la resistencia cruzada a ambos herbicidas, si bien en el caso de la nicotina el mutante presenta una resistencia significativamente mayor que en el caso del MPTA. Así, una concentración de 0,61 μM de

nicotina es suficiente para reducir el contenido de carotenoides a la mitad en la estirpe silvestre mientras que en la mutante se necesita una concentración 32,8 veces superior. Con MPTA la cantidad de herbicida necesaria para provocar el mismo efecto es sólo 6,7 veces superior en la estirpe mutante.

TABLA 3. Valores de I_{50} (mM) para la inhibición *in vivo* y factores de resistencia del mutante MPTA1 frente a nicotina y MPTA.

Herbicida	MPTA1	S.6803
nicotina	20 (32,8)	0,61
MPTA	$1,4 \times 10^{-4}$ (6,7)	$2,1 \times 10^{-5}$

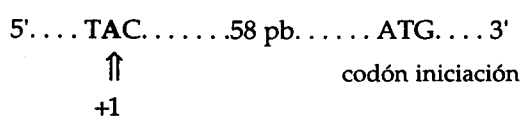
Los valores entre paréntesis indican los factores de resistencia calculados como la razón entre la I_{50} de la estirpe mutante y la I_{50} de la estirpe silvestre.

3.5. ESTUDIO DE LA ORF sll0147 (ORF B) DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

El estudio de la ORF B de *Synechocystis* se ha desarrollado a dos niveles. Por una parte se ha localizado la región promotora del gen, y por la otra se ha estudiado la posible función de la proteína codificada.

3.5.1. Localización de la región promotora de sll0147 (ORF B)

Para localizar la región promotora de la ORF B de *Synechocystis* se determinó dónde se encontraba el inicio de la transcripción de este gen. Para ello se realizaron reacciones de extensión del cebador (apartado 2.5.11.) utilizando como molde RNA de *Synechocystis* y como cebador de la síntesis el oligonucleótido *lyc* 5 (apartado 2.5.10.3.) situado 18 pb "aguas abajo" del codón ATG. De esta forma se encontró que la posición +1 corresponde a una A (figura 10) y se encuentra 59 pb por delante del codón ATG:



La posición +1 determinada se localiza a 14 pb de la hipotética región -10 señalada en la figura 7.

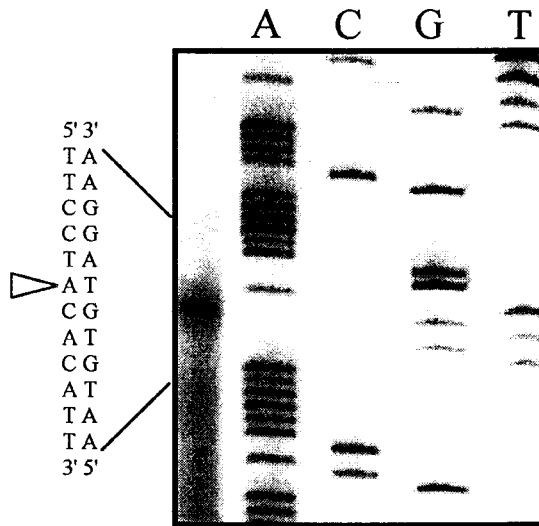


Figura 10. Autorradiografía de un gel de secuenciación donde se muestra el inicio de la transcripción de la ORF B de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

3.5.2. Estudio de la función de sll0147 (ORF B)

Para determinar la función de la proteína codificada por la fase de lectura abierta ORF B se llevaron a cabo dos estrategias paralelas. Por un lado se expresó la ORF B en *E. coli* para realizar experimentos de complementación heteróloga y por el otro, se estudió su pérdida de función en *Synechocystis*.

3.5.2.1. Expresión de sll0147 (ORF B) bajo el control del promotor *trc* de *E. coli*

Con el fin de determinar si la ORF B de *Synechocystis* codificaba alguna proteína implicada en la ruta de carotenogénesis se realizaron experimentos de

complementación con células de JM101 portadoras de distintos plásmidos con genes para la síntesis de carotenoides (tabla 2). Se construyó un plásmido en el que la ORF B quedase bajo el control del promotor *trc* de *E. coli* de manera que se potenciase su expresión. Para ello se clonó dicha ORF en el plásmido pTrc99A en fase con el codón ATG del mismo.

En la región clonada de DNA de *Synechocystis* no existen puntos de corte compatibles con los del sitio de clonación múltiple de pTrc99A que permitan la fusión traduccional deseada. Por tanto se siguió una estrategia alternativa consistente en clonar primero un fragmento de pBF300 portador de la ORF B silvestre en el punto *Hind* III de pTrc99A. Luego se sustituyó el extremo 5' de ORF B dentro de esta construcción por un fragmento de DNA sintético (apartado 2.5.9.) con un punto de corte que permite enlazar el inicio de ORF B al codón ATG del vector. Así se creó el plásmido pBF3000 (figura 11) en el que la proteína codificada por ORF B lleva 2 aminoácidos extra en el extremo amino:

MELREL. . . . versus MREL. . . .

Para crear el plásmido equivalente pero que expresase la ORF B mutante, el fragmento *Afl* II de 1,56 kb de pBF3000 en el que se localiza la posición mutada se sustituyó por el correspondiente obtenido por restricción *Afl* II del plásmido pBF100, que lleva el DNA de MPTA1. Se creó el plásmido pBF1000 con la proteína mutante expresándose a partir del promotor *trc* de *E. coli* (figura 11).

Con los plásmidos pBF1000 y pBF3000 se realizaron experimentos de complementación heteróloga en células de JM101 que acumulan distintos carotenoides (tabla 2). Así, células productoras de fitoeno, ζ -caroteno, neurosporeno, licopeno y β -caroteno se transformaron con pBF1000 y con pBF3000 por separado (apartado 2.5.2.2.). Los transformantes se cultivaron como se indica en el apartado 2.1.2.3. hasta que apareció coloración en las colonias. En ningún caso hubo cambio de coloración respecto de un control de células no transformadas. También se analizaron los carotenoides presentes en cultivos de los transformantes sin ningún resultado positivo. Estos datos parecían indicar que ORF B no era ninguna enzima de la ruta biosintética de carotenoides, aunque también se podía suponer que la proteína no fuese funcional en *E. coli*.

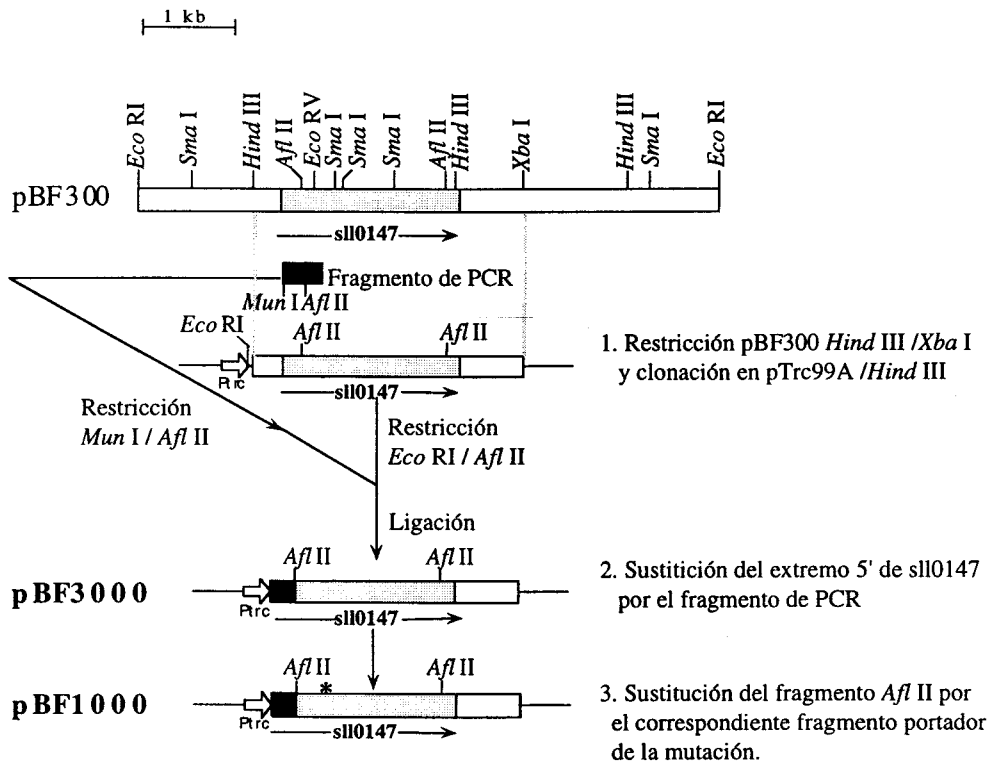


Figura 11. Esquema de construcción de los plásmidos pBF3000 y pBF1000.

Se muestran los pasos seguidos en la clonación de las versiones mutante y silvestre de la ORF *sll0147* de *Synechocystis* bajo el control del promotor *trc* (*P_{trc}*) en el vector de expresión pTrc99A. La mutación en pBF1000 se indica con un asterisco (*).

3.5.2.2. Inactivación de ORF B en *Synechocystis*

Ante los resultados obtenidos en *E. coli* decidimos analizar si la pérdida de función de ORF B en *Synechocystis* producía algún fenotipo característico que pudiese aclarar su función. Para ello se crearon mutantes por inserción del gen *npt*.

El gen *npt* obtenido como fragmento de restricción *Hinc* II a partir del plásmido pRL161 se clonó en el punto *Eco* RV del plásmido pBF3010. Se seleccionó la construcción con el gen *npt* en la orientación contraria a ORF B (figura 12) y se utilizó para transformar células de la estirpe silvestre de *Synechocystis* (apartado 2.5.2.1.). Los transformantes seleccionados en medio suplementado con kanamicina no sobrevivieron a la primera ronda de replicación. Este resultado estaba indicando que la proteína

codificada por ORF B es esencial para la supervivencia de *Synechocystis*, al menos en las condiciones de crecimiento utilizadas: autotrofia y con una intensidad de luz de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se repitió la transformación seleccionando a los transformantes en condiciones de fotoheterotrofia, en autotrofia con luz a $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en condiciones de crecimiento heterotrófico activado por luz (apartado 1.2.2.). En ningún caso se pudo mantener la supervivencia de los transformantes lo que sugiere que ORF B debe de ser un gen esencial; aunque no se puede excluir que la inactivación de *sll0147* tenga efecto polar sobre la expresión de alguno de los genes que se encuentran "aguas abajo" de esta ORF.

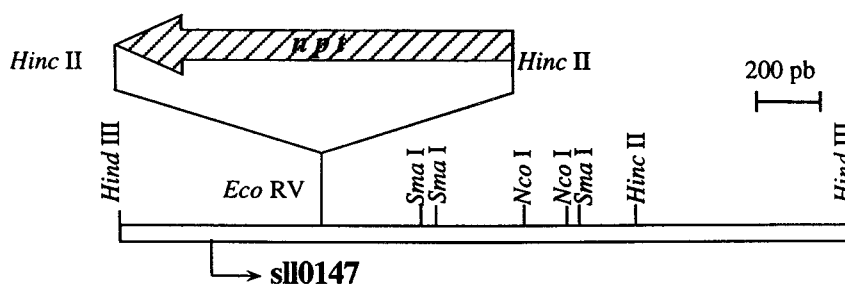


Figura 12. Estrategia de inactivación de la ORF *sll0147* (ORF B) de *Synechocystis*.

Se muestra la construcción transferida a *Synechocystis* para inactivar la ORF *sll0147*.

En resumen, los datos obtenidos no nos permiten concluir que *sll0147* sea la ciclasa del licopeno de *Synechocystis* pero ante resultados negativos tampoco se puede excluir esta posibilidad.

3.6. CLONACION DE *crtB*

Nuestro grupo aisló el gen *crtP* que codifica la enzima fitoeno desaturasa de *Synechocystis* (Martínez-Férez *et al.*, 1991). En *Synechococcus* sp.PCC 7942 (Chamovitz *et al.*, 1992) se sabe que este gen se encuentra ligado físicamente al de la fitoeno sintasa o

crtB. Por otra parte, se había visto que los genes de la ruta biosintética de carotenoides se encuentran formando agrupaciones en *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1989), *Erwinia herbicola* (Sandmann *et al.*, 1990; Hundle *et al.*, 1991; Schnurr *et al.*, 1991), *Erwinia uredovora* (Misawa *et al.*, 1990), y *Myxococcus xanthus* (Ruiz-Vázquez *et al.*, 1993; Botella *et al.*, 1995). Con estos antecedentes decidimos investigar la posibilidad de que en las inmediaciones de *crtP* de *Synechocystis* hubiese algún gen involucrado en la síntesis de carotenoides.

3.6.1. Aislamiento de clones solapantes con el inserto de pAV12

Para nuestro propósito disponíamos de una genoteca de *Synechocystis* sp. PCC 6803 construída en el vector λ -ZAP II (apartado 2.5.1.) (Bullock *et al.*, 1987) cedida por el Dr. Jack Preiss. A partir de esta genoteca pretendíamos aislar clones solapantes con un fragmento de DNA portador de *crtP*, que nos permitiesen mapear una zona suficientemente extensa como para detectar otros genes que hubiese en las inmediaciones del ya aislado *crtP*.

λ -ZAP II lleva el vector de clonación pBluescript SK(-) sustituyendo a una región prescindible del genomio del fago λ y flanqueado por sitios de iniciación y terminación de síntesis de DNA para los fagos M13 o f1 (fagos auxiliares). Los insertos de DNA en λ -ZAP II se clonan dentro del mencionado plásmido. De esta manera la coinfección con λ -ZAP II y uno de los fagos auxiliares conduce a la síntesis del DNA situado entre los puntos de inicio y fin de replicación de M13 o f1. El DNA lineal monocatenario sintetizado es circularizado, replicado y empaquetado como partículas del fago auxiliar que se liberan de las células. La posterior infección de *E. coli* con estos fagos quiméricos y la selección en medio suplementado con ampicilina [resistencia codificada por pBluescript SK(-)] permite la obtención de colonias de la bacteria hospedadora que llevan el clon de interés en forma de plásmido.

Con objeto de aislar la región del genomio de *Synechocystis* colindante con el gen *crtP*, primero se determinó el número de clones a analizar de la genoteca construída en λ -ZAP II para que estuviera representada la totalidad del genomio de *Synechocystis* al menos 2 veces. Se estimó que 6000 clones eran suficientes por lo que se procedió a la infección de células de XL1-Blue (apartado 2.5.3.) con la dilución apropiada de fagos que permitía obtener tal número de calvas de lisis y se inocularon en placas de Petri a

razón de 600 calvas por placa. El DNA de los fagos se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se llevó a cabo hibridación *in situ* (apartado 2.5.8.) utilizando como sonda el inserto del plásmido pAV12 portador del gen *crtP* del mutante AV1 (resistente a norflurazón) de *Synechocystis* (Martínez-Férez *et al.*, 1994b). Las placas de Petri con los fagos λ -ZAP II se guardaron a 4°C para mantener su viabilidad.

De la primera ronda de aislamiento se identificaron 9 clones que hibridaban con el inserto de pAV12. Las 9 calvas de lisis se recortaron de las correspondientes placas de Petri y se depositaron en tubos Eppendorf con 500 μ l de tampón SM (apartado 2.5.3.) y 20 μ l de cloroformo. Los fagos se desprendieron del agar agitando vigorosamente durante 1-2 min. Estas preparaciones se utilizaron para infectar de nuevo células XL1-Blue y repetir todo el proceso de transferencia e hibridación con objeto de evitar la presencia de clones no positivos que se pudieran haber aislado junto con los clones de interés. En esta ocasión se utilizaron 9 alícuotas del cultivo de XL1-Blue que se infectaron con cada uno de los clones aislados. Se inoculó una placa de Petri por cada infección con una densidad de calvas de lisis de 100 por placa. Finalizada la hibridación se obtuvieron 19 clones positivos repartidos en 7 de las 9 cajas preparadas. Supuestamente los clones de una misma caja deberían ser idénticos ya que procedían de una misma calva del primer aislamiento. Por tanto, contábamos con aislar al menos 7 clones individuales y todos solapantes con el fragmento de DNA que se usó como sonda.

El siguiente paso consistió en obtener los clones de interés en forma de plásmido. Para ello se eligieron al azar 2 calvas, cuando había más de una positiva, o la única positiva de cada uno de los 7 clones aislados y se procedió a la escisión *in vivo* de los plásmidos pBluescript SK (-) conteniendo el DNA de *Synechocystis* (apartado 2.5.4.). De esta manera se obtuvieron colonias resistentes a ampicilina para 5 de los 7 clones aislados. A partir de 2 colonias de cada uno de estos 5 clones se extrajo DNA plasmídico y se sometió a restricción con la enzima *Eco* RI (apartados 2.5.5.1. y 2.5.7.1.) para sacar los insertos de los plásmidos. Los fragmentos de restricción se separaron por tamaño en un gel de agarosa (apartado 2.5.5.3.), se transfirieron a membranas de nylon y se sometieron a hibridación usando como sonda el inserto de pAV12 (apartados 2.5.8.1. y 2.5.8.5.). Así verificamos que 4 de los 5 clones contenían insertos de DNA que realmente hibridaban con la sonda mientras que el restante resultó ser un falso positivo. Los plásmidos aislados se denominaron pBF1-pBF4. El proceso de aislamiento de estos clones se esquematiza en la figura 13.

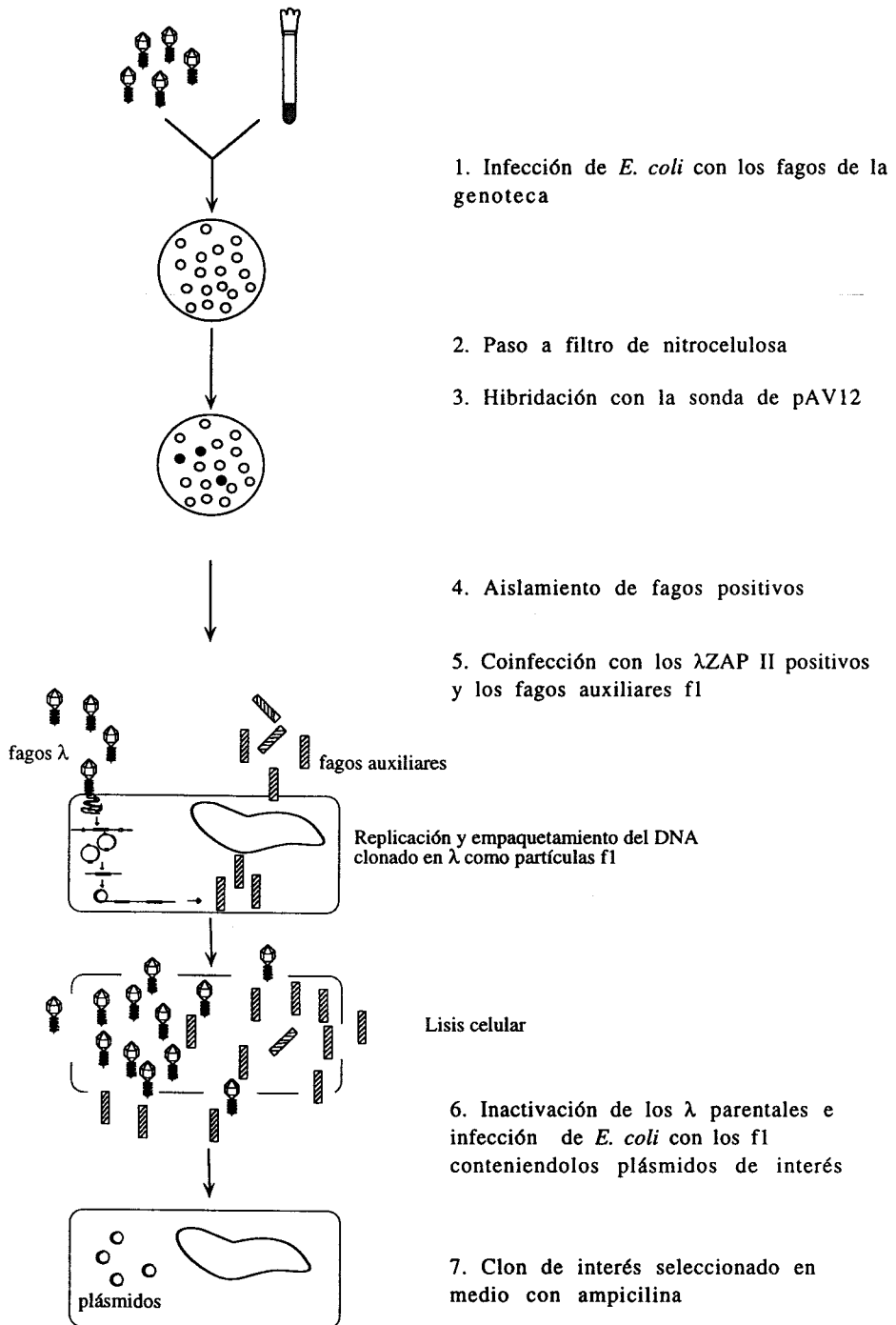


Figura 13. Esquema del proceso de aislamiento de clones solapantes con el inserto de pAV12 a partir de la genoteca de *Synechocystis* en λ -ZAP II.

3.6.2. Mapa de restricción de los clones pBF1-pBF4

Una vez aislados los 4 clones solapantes con un fragmento de DNA de *Synechocystis* portador del gen *crtP*, pretendíamos realizar un alineamiento de todos los fragmentos clonados para establecer la región total que representaban en el genoma de la cianobacteria. Con este fin se realizaron distintas restricciones (apartado 2.5.7.1.) tanto de los plásmidos pBF1-pBF4 como de pAV12. El mapa de restricción resultante se muestra en la figura 14.

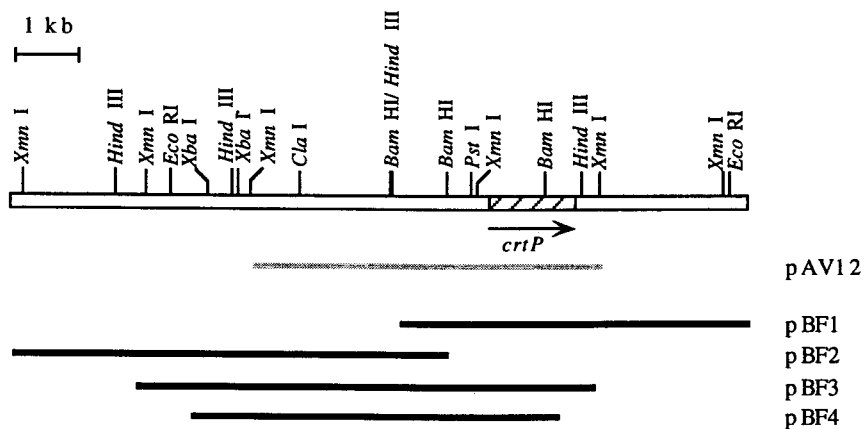


Figura 14. Mapa de restricción de la región de DNA de *Synechocystis* clonada alrededor del gen *crtP*.

Se muestra el mapa de restricción de los insertos de cada uno de los clones aislados a partir de la genoteca de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en λ -ZAP II así como el del inserto de pAV12.

Como se puede observar, entre los plásmidos pBF1 y pBF2 habíamos clonado una región de 12 kb de DNA en las que se incluía *crtP*. Concretamente teníamos 2,3 kb "aguas abajo" del gen *crtP* y aproximadamente 7,5 kb "aguas arriba" del mismo gen. Los plásmidos pBF3 y pBF4 constituían subclones intermedios de esta zona.

3.6.3. Inserción de *npt* en varias posiciones de la región clonada

Nuestro objetivo fundamental consistía en determinar si en las proximidades de *crtP* existía algún otro gen implicado en la carotenogénesis. Así pues, decidimos realizar inserciones del gen *npt* en distintos puntos de la región que habíamos clonado y estudiar el efecto que esto producía en *Synechocystis*.

3.6.3.1. Construcción de plásmidos portadores de *npt*

Se prepararon distintas construcciones con las que llevar a cabo la mutagénesis de *Synechocystis* (figura 15). Primero se construyeron distintos plásmidos que tuvieran dianas de restricción únicas en las que clonar copias del gen *npt* y a continuación se insertaron los marcadores de resistencia a kanamicina en dichas dianas:

1.- El plásmido pBF1 se digirió con *Bam* HI y con *Eco* RI y se aisló un fragmento de 3,5 kb que contenía un punto de corte para la enzima *Hind* III. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-7Z (f+) cortado con las mismas enzimas de manera que se había eliminado el punto *Hind* III del sitio de clonación múltiple. Así se generó el plásmido pBF11 portador de un sólo sitio *Hind* III. Por otro lado, el plásmido pRL161, que lleva el gen *npt* flanqueado de manera simétrica por varios sitios de restricción, se digirió con *Hind* III y se aisló un fragmento de DNA de 1,3 kb correspondiente al gen *npt*. Este fragmento se clonó en ambas orientaciones en el plásmido pBF11 cortado con *Hind* III generándose los plásmidos pBFK110 y pBFK111 respectivamente.

2.- El plásmido pBF2 se cortó con *Hind* III y *Xba* I y se aisló un fragmento de DNA de 1,5 kb que llevaba un punto de restricción *Eco* RI. A su vez, el vector de clonación pBluescriptII SK (+) se sometió a la misma digestión doble con lo que se eliminó el punto *Eco* RI del sitio de clonación múltiple. El vector cortado como se indica sirvió para clonar el fragmento aislado a partir de pBF2 y se creó el plásmido pBF21 que sólo posee un punto de corte para la enzima *Eco* RI. A partir del plásmido pUCK2 se obtuvo el gen *npt* como un fragmento de restricción *Eco* RI de 1,2 kb. Finalmente el marcador se clonó en ambas orientaciones en pBF21 cortado con *Eco* RI. Los nuevos plásmidos con el gen *npt* se denominaron pBFK210 y pBFK211.

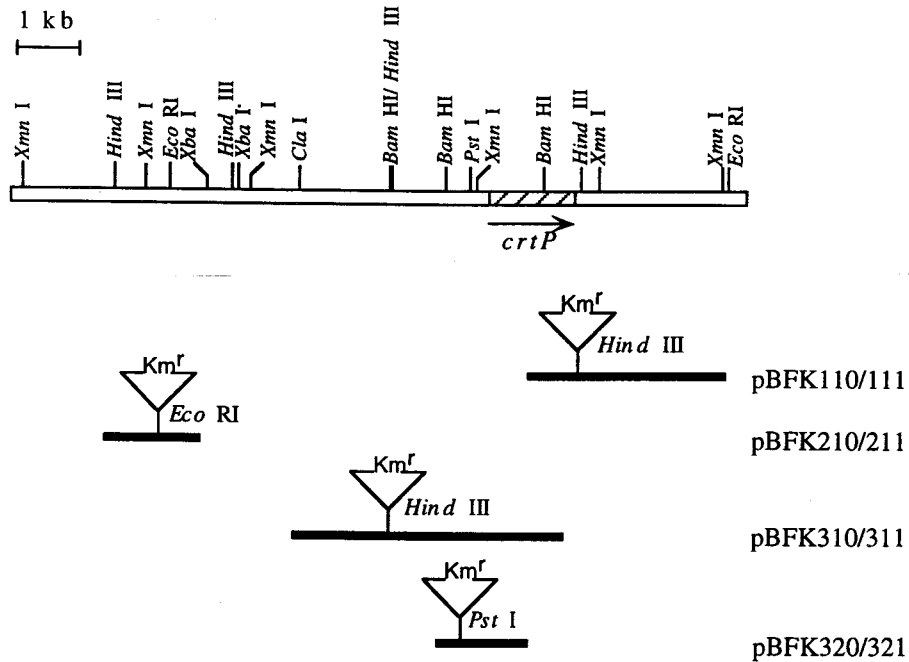


Figura 15. Estrategia de inserción del gen *npt* en los alrededores de *crtP*.

En la figura se indican los mapas de restricción de los insertos de los distintos plásmidos en los que se introdujo un gen *npt* (Km^r) y la diana en que se clonó. A la derecha se indica el nombre de cada pareja de plásmidos en los que la diferencia es la orientación del marcador de resistencia.

3.- El plásmido pBF3 fue digerido con las enzimas *Cla* I, que corta dentro del inserto, y *Sac* I que lo hace en el sitio de clonación múltiple de pBluescript SK (-) inmediatamente a continuación del inserto. Tras análisis en un gel de agarosa se aisló un fragmento de DNA de 4,5 kb que llevaba un sitio de restricción *Hind* III. El vector pBluescriptII SK (+) se cortó también con *Cla* I y *Sac* I de forma que se excluía la diana *Hind* III presente. En este vector se clonó el fragmento de 4,5 kb aislado a partir de pBF3 dando lugar a otro plásmido que contiene un único sitio de corte para *Hind* III. El nuevo plásmido se llamó pBF31. Para obtener el gen *npt* como fragmento *Hind* III se utilizó el plásmido pRL161 y luego se ligó en las dos orientaciones al pBF31 también cortado con *Hind* III. De esta forma se obtuvieron los plásmidos pBFK310 y pBFK311.

4.- El plásmido pBF3 fue digerido con *Bam* HI y se aisló un fragmento de DNA de 1,5 kb que lleva un punto de corte *Pst*I. En esta ocasión el vector elegido para clonación fue pGEM-7Z (f+) por carecer de dianas *Pst* I. Por tanto, se digirió con *Bam* HI y en él se clonó en las dos orientaciones posibles el fragmento de pBF3 que se había purificado. Dado que la diferencia entre ambas construcciones radicaba exclusivamente en la orientación del inserto (DNA de *Synechocystis*) respecto del vector de clonación y que esto no afectaría a la hora de insertar un gen *npt* en un determinado punto del genomio de la cianobacteria, elegimos al azar una de ellas que se llamó pBF32 para proseguir el trabajo (ver figura 15). Por último el plásmido pRL464 se cortó con la enzima *Pst* I para obtener el gen *npt* y se clonó en el mismo punto de pBF32 en ambas orientaciones. Se obtuvieron así los plásmidos pBFK320 y pBFK321.

3.6.3.2. Mutagénesis de *Synechocystis* sp. PCC 6803

La estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue transformada con los plásmidos pBFK110, pBFK111, pBFK210, pBFK211, pBFK310, pBFK311, pBFK320 y pBFK321 (apartado 2.5.2.1.). Se seleccionaron los transformantes en medio conteniendo kanamicina. Esperábamos que los transformantes hubieran integrado en su genomio las construcciones de los plásmidos de la serie pBFK de manera que cada uno presentaría una interrupción en el punto del cromosoma donde se encontrara insertado un marcador de resistencia a kanamicina.

Se obtuvieron transformantes en todos los casos y se sometieron a varias rondas de segregación a fin de favorecer el establecimiento del gen *npt* en todos los cromosomas de la cianobacteria. Después de esto, las colonias de todos los transformantes presentaban un aspecto (tamaño y color) similar y un crecimiento también similar a los de las colonias de la estirpe silvestre excepto para aquellos que poseían el gen *npt* insertado en el punto *Hind* III que se encuentra detrás del gen *crtP*, es decir, aquellos transformantes derivados de pBFK110 y pBFK111. Las estirpes mutantes, denominadas BFK111 y BFK110, crecían muy despacio e iban adquiriendo un color amarillento típico de clorosis. Estos resultados nos indicaron que en el caso de BFK110 y BFK111 parecía verse afectada una función importante de *Synechocystis* y probablemente, un gen esencial.

3.6.3.3. Localización del gen *crtB*

Tras la mutagénesis referida en el apartado anterior la Dra. Isabel María Martínez Férrez, miembro de nuestro grupo, se encargó de secuenciar la región de *Synechocystis* "aguas abajo" de *crtP* donde se había establecido la posible presencia de otro gen. De esta forma se encontró que a 62 pb del final de *crtP*, tal como indicaban los resultados previos según los cuales la inserción de un gen *npt* detrás de *crtP* provocaba un fenotipo diferencial en el mutante correspondiente, comenzaba una fase de lectura abierta que codificaba una proteína de 337 aminoácidos.

La comparación de secuencias con la base de datos EMBL así como la complementación heteróloga en *Escherichia coli* (apartados 2.7. y 3.5.2.1.) mostrarían que la ORF aislada correspondía al gen de la fitoeno sintasa de *Synechocystis* o gen *crtB* (Martínez-Férez *et al.*, 1994a).

Cuando recientemente hemos dispuesto de la secuencia completa del genoma de *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996) se ha podido comprobar que las inserciones producidas por los plásmidos pBFK210/211, pBFK310/311 y pBFK320/321 no interrumpen ningún gen que pueda, potencialmente, estar implicado en la carotenogénesis.

3.7. LOCALIZACION DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCION DE LOS GENES *crtP* Y *crtB* DE *Synechocystis*

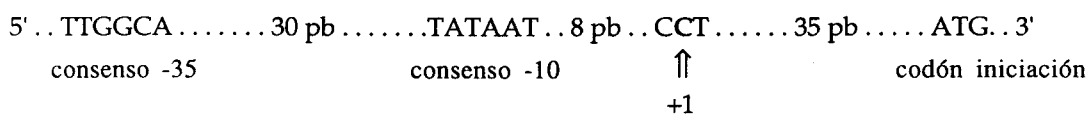
En nuestro laboratorio se han aislado los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Martínez-Férez y Vioque, 1992; Martínez-Férez *et al.*, 1994a). Ambos genes se encuentran en la misma orientación en el genoma de la cianobacteria y separados por sólo 62 pares de bases (Martínez-Férez *et al.*, 1994a).

Respecto de los promotores de estos genes, en el caso de *crtP* se habían encontrado posibles secuencias consenso con las correspondientes -10 y -35 de los promotores de *E. coli* (Martínez-Férez y Vioque, 1992) pero no así en el caso de *crtB* (Martínez-Férez *et al.*, 1994a). Estudios realizados con el gen *crtP* de un mutante de *Synechocystis* resistente a norflurazón habían mostrado que la región situada entre las posiciones -116 y -44, considerando la posición +1 la A del codón ATG del inicio de *crtP*, es necesaria para la expresión de dicho gen (Martínez-Férez, 1994). También en este trabajo se había visto

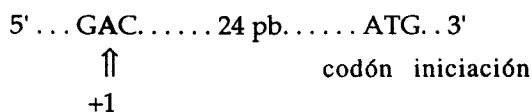
que la expresión de *crtB* no se ve afectada por inserciones en *crtP*, lo cual podría indicar que, a pesar de la proximidad de estos genes en el genomio de *Synechocystis*, cada uno posee su propio promotor.

Con objeto de localizar el inicio de transcripción de los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* (posición+1) se realizaron reacciones de extensión del cebador (apartado 2.5.11.) utilizando RNA de *Synechocystis* sp. PCC 6803 como molde y dos oligonucleótidos sintéticos, *pds* 1 y *pds* 8 (apartado 2.5.10.2.), como cebadores de la síntesis de DNA conducida por RNA. El primero de los oligonucleótidos incluye el codón ATG del gen *crtP* y se extiende 3 nucleótidos "aguas arriba" del mismo y el segundo se encuentra 46 nucleótidos "aguas abajo" del codón ATG del gen *crtB*. Las reacciones de secuenciación que sirvieron como marcadores de tamaño del producto de extensión, se llevaron a cabo utilizando los mismos oligonucleótidos como cebadores y como DNA molde el plásmido pBF1 (apartados 2.5.10.3. y 3.6.2.). Los resultados se muestran en la figura 16.

En el caso del gen *crtP* se aprecia una banda que marca el inicio del RNA mensajero situada 35 pares de bases por delante del codón ATG y 10 pares de bases por detrás de la secuencia -10 consenso con la de promotores de *E. coli*:



Para *crtB* aparecen varias bandas de parada pero consideramos que la superior de ellas debe corresponder al inicio de la transcripción del gen, ya que indicaría el inicio del RNA mensajero de mayor tamaño. En este caso la posición +1 se encuentra situada 24 pares de bases "aguas arriba" del codón ATG del gen *crtB*:



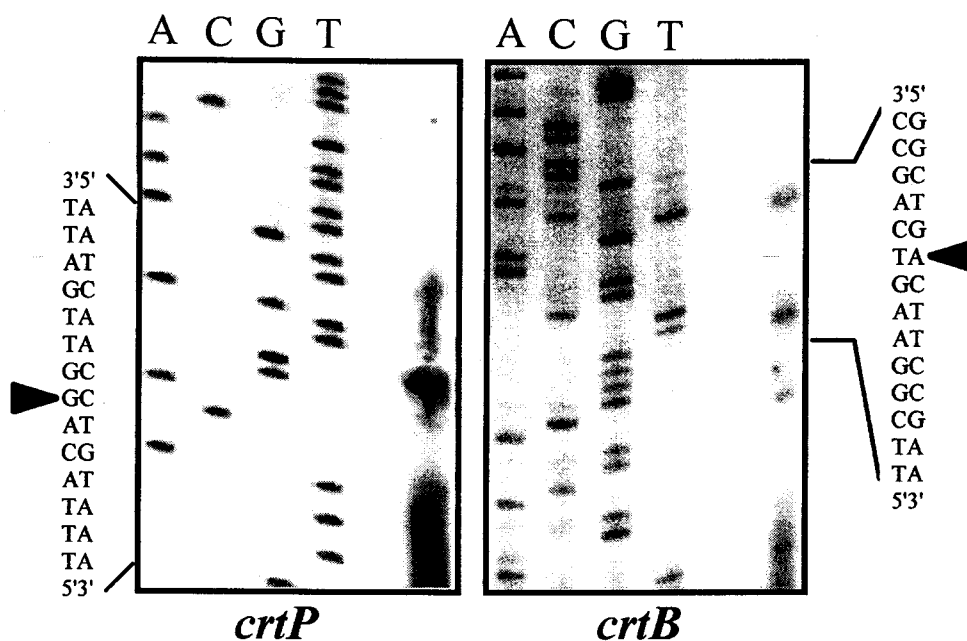


Figura 16. Autorradiografía de los geles de poliacrilamida en los que se muestra la situación del posible sitio de inicio de la transcripción de los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis*.

Este resultado sitúa al codón de iniciación 28 pb "aguas abajo" del que se determinó en un principio por secuenciación (Martínez-Férez *et al.*, 1994a) por lo que los genes *crtP* y *crtB* se encontrarían separados por 147 pb en vez de por 62.

Los resultados obtenidos indican que los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* poseen distintos promotores y concuerdan con estudios previos en los que la interrupción del gen *crtP* no influye sobre la expresión de *crtB* (Martínez-Férez, 1994) como se mencionó anteriormente, lo que de nuevo indicaría la existencia de promotores independientes para estos genes.

3.8. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LOS GENES *crtP* Y *crtB* DE *Synechocystis*

La biosíntesis de carotenoides es un proceso regulado por luz (Harding y Shropshire, 1980). En cianobacterias se producen cambios en la cantidad y composición

de carotenoides como respuesta a cambios en la intensidad y calidad de la luz (Hirschberg y Chamovitz, 1994). Este fenómeno no ha sido estudiado desde el punto de vista de regulación de la expresión génica salvo en el caso de un gen que codifica una proteína de unión a carotenos en *Synechococcus* sp. PCC 7942, para el que se ha descrito una inducción por alta luz (Reddy *et al.*, 1989).

En nuestro laboratorio se habían realizado algunos estudios acerca de la regulación por la intensidad de luz de la expresión de los promotores de *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* (Martínez-Férez, 1994). Así, en condiciones de alta intensidad de luz ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se había observado un incremento en la actividad del promotor de *crtP* de entre 5 y 10 veces con respecto a la actividad estimada en condiciones de intensidad luminosa menor ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La máxima activación se encontró tras 22 horas de exposición a alta intensidad de luz y no se detectó estimulación significativa con menos de 3 horas de exposición. Los experimentos realizados con *crtB* mostraron que la expresión de este gen no parece estar regulada por la intensidad de luz de la misma manera que *crtP* ya que tras 22 horas de exposición a alta intensidad lumínica, condiciones de máxima activación para *crtP*, sólo se apreció una ligera inducción de la actividad del promotor de *crtB*.

En este trabajo se ha profundizado en el estudio de la regulación por luz de la expresión de los promotores de *crtP* y *crtB* para lo cual se han desarrollado dos estrategias paralelas. Por una parte se han analizado por hibridación los mRNAs de ambos genes en cultivos de *Synechocystis* sometidos a distintas condiciones de iluminación. Por otra parte, se ha utilizado una aproximación indirecta a través del estudio de la actividad CAT de estirpes de *Synechocystis* portadoras del gen *cat* sin promotor fusionado a regiones del extremo 5' de *crtP* y *crtB*.

3.8.1. Influencia de la intensidad de luz sobre la expresión del gen *crtP* de *Synechocystis*

*3.8.1.1. Análisis de los mRNA de *crtP* en distintas condiciones de iluminación*

Se ha estudiado lo que ocurre con los transcritos del gen *crtP* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuando cultivos de esta cianobacteria se pasan de crecimiento en oscuridad a crecimiento en luz de distintas intensidades.

En primer lugar se incubó un cultivo a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta alcanzar $1,5 \mu\text{g Chl/ml}$ y entonces se mantuvo 12 h en oscuridad. Posteriormente se inocularon otros 10, 4 de los cuales se incubaron a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Los otros 6 se incubaron dos a dos a 10, 150 y $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5 y 30 min respectivamente. Se extrajo el RNA de todos los cultivos (apartado 2.5.6.1.) y se analizó por hibridación (apartado 2.5.8.7.). Se usó como sonda un fragmento interno del gen *crtP* de 611 pb producto de restricción con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RV. Como control se realizó una hibridación previa en la que se utilizó como sonda el gen *rnpB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de 457 pb (figura 17A).

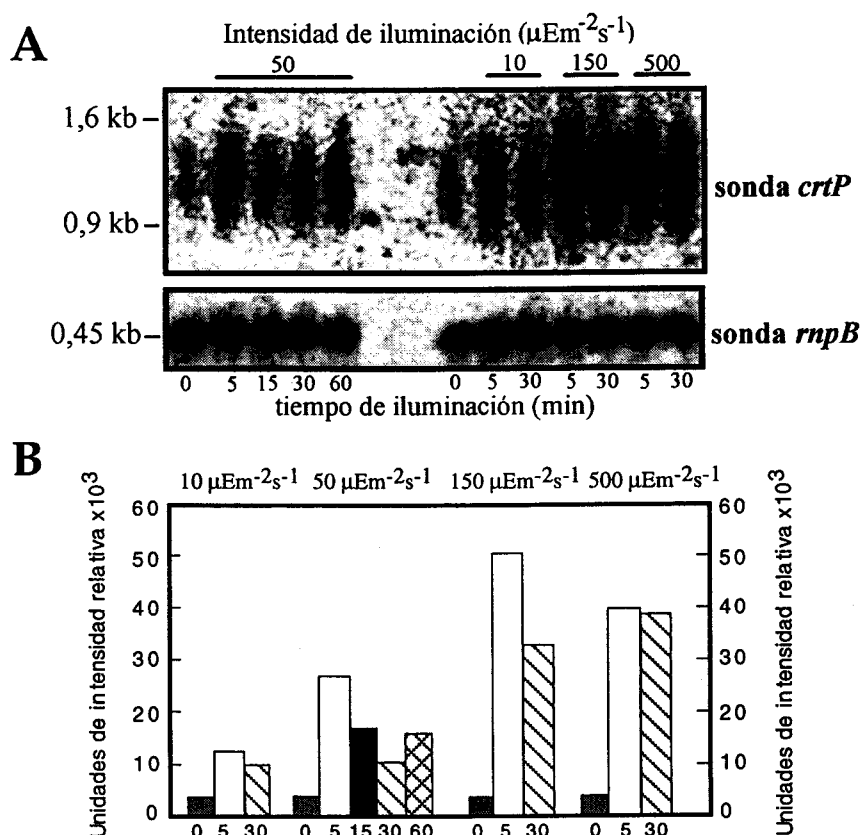


Figura 17. Inducción del mRNA del gen *crtP* por luz.

A) Hibridación de RNA total de *Synechocystis* en las condiciones de iluminación indicadas (ver texto y apartado 2.1.1.2.) con sondas correspondientes a los genes *crtP* y *rnpB*. A la izquierda se indica el tamaño de los transcritos.

B) Histograma donde se muestra la abundancia relativa del mensajero de *crtP* en distintas condiciones de iluminación. La radiactividad contenida en el filtro del apartado A) se cuantificó y las unidades de intensidad relativa se calcularon como $\text{cpm sonda } crtP / \text{cpm sonda } rnpB$ en cada carril. Los números en el eje X indican el tiempo de iluminación en minutos.

Después de realizar las hibridaciones la radiactividad de cada carril se cuantificó y normalizó respecto a los valores obtenidos para la sonda de *rnpB* (figura 17B).

Se encontró que tras 12 h en oscuridad se detectaba el transcrito de *crtP* y que 5 min de exposición a la luz de cualquier intensidad eran suficientes para incrementar significativamente la expresión del gen (figura 17). El incremento máximo, de 20 veces respecto del valor estimado en oscuridad, se encontró tras 5 min de incubación a $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La menor amplitud de respuesta se obtuvo con la menor intensidad luminosa ensayada.

3.8.1.2. Obtención de las estirpes FG502 y KWCAT de *Synechocystis*

Los trabajos realizados con anterioridad sobre la regulación de la expresión del promotor de *crtP* de *Synechocystis* se habían realizado determinando la actividad CAT de una estirpe denominada MF1021 cultivada en distintas intensidades de luz (Martínez-Férez, 1994). Tal estirpe lleva en plásmidos la fusión de un fragmento de la región 5' de *crtP* y un gen *cat* sin promotor. Se determinó que la inducción de la actividad CAT observada cuando MF1021 se cultivaba en alta luz ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) frente a luz normal ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no se debía a un aumento proporcional en el número de copias del plásmido. En cualquier caso, a fin de evitar el efecto de algún tipo de regulación a que pudieran estar sometidos los plásmidos que incidieran sobre las medidas de actividad CAT, decidimos introducir la construcción de la estirpe MF1021 en el cromosoma de *Synechocystis* para proseguir los estudios de activación del promotor de *crtP*. Para ello nos servimos del plásmido pKW1188 que permite realizar inserciones en una región prescindible del cromosoma de la cianobacteria (Williams, 1988).

En primer lugar se construyeron los plásmidos pFG502 y pKWCAT (figura 18A). El plásmido pMF1021 se trató con las enzimas *Bam* HI y *Sma* I y se aisló el fragmento de DNA de 2,06 kb que lleva 149 pb de la región 5' de *crtP* (de la posición -83 a la +66 siendo la posición +1 el inicio de la transcripción de *crtP*) delante del gen *cat*. Este DNA se trató con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y se clonó en el punto *Hinc* II del plásmido pKW1188 (apartado 2.5.7.). Se obtuvo el plásmido pFG502 con el inserto en la misma orientación que el gen *npt* del vector. Paralelamente se aisló el gen *cat* sin promotor del plásmido pJS133 como un fragmento de restricción *Sma* I de

0,7 kb y se clonó en el punto *Hinc* II de pKW1188 (apartado 2.5.7.). Así se obtuvo el plásmido pKWCAT con el gen *cat* sin promotor en la misma orientación que el *npt* del vector. Este plásmido serviría como control de la posible expresión del gen *cat* debida a secuencias colindantes al sitio de inserción. En ninguna de las clonaciones se pudo obtener la orientación contraria del inserto respecto del gen *npt*.

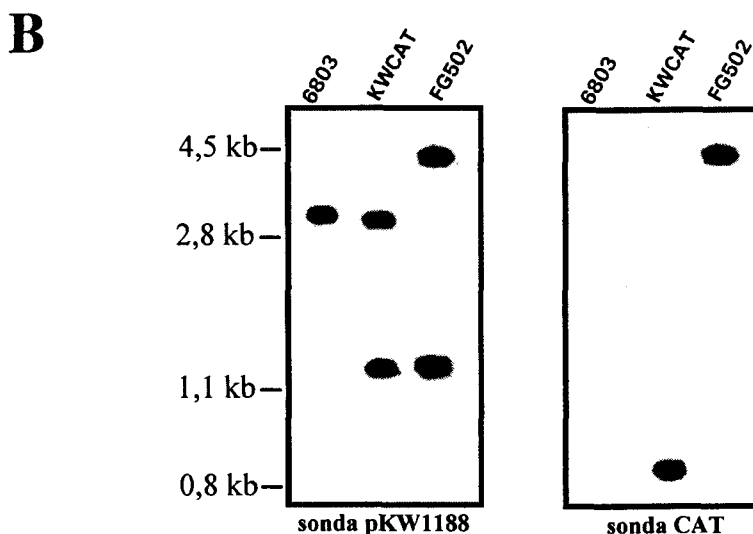
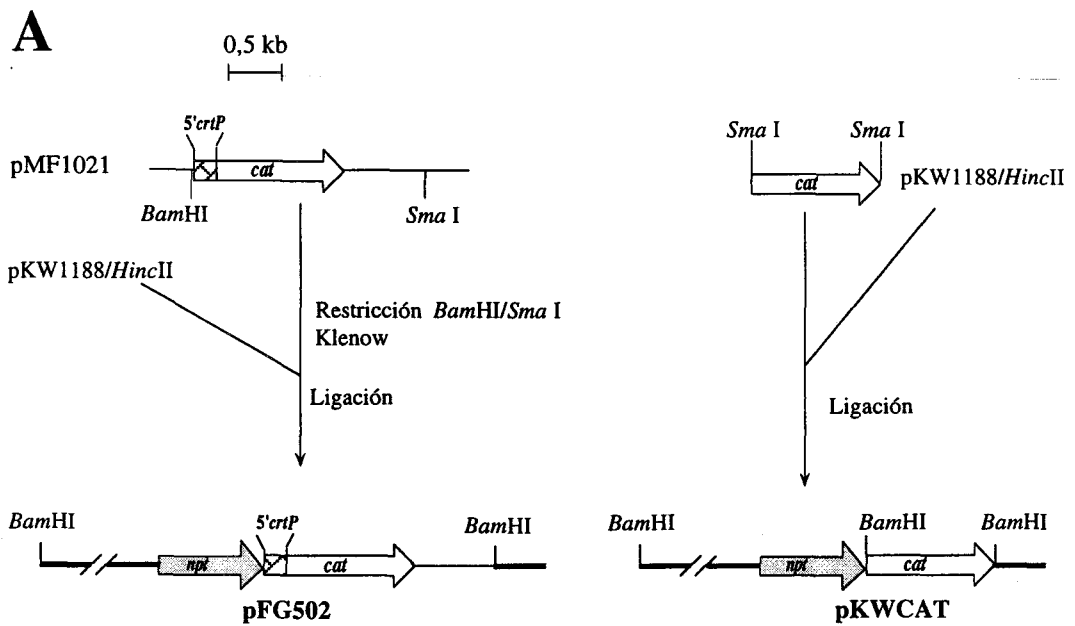


Figura 18. Construcción de las estirpes FG502 y KWCAT de *Synechocystis*.

A) Esquema de las construcciones introducidas en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en las estirpes FG502 y KWCAT.

B) Hibridación del DNA total de las estirpes silvestre (6803), FG502 y KWCAT digerido con *Bam* HI con una sonda del vector pKW1188 y con otra del gen *cat*. Se indica el tamaño de los marcadores.

Se transformó la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con los plásmidos pFG502 y pKWCAT y se seleccionaron los transformantes en medio suplementado con kanamicina (apartado 2.5.2.1.). Las nuevas estirpes, denominadas FG502 y KWCAT, se sometieron a varias rondas de segregación en medio selectivo tras las cuales se les extrajo DNA genómico y se digirió con *Bam* HI (apartados 2.5.5.2. y 2.5.7.1.). Las restricciones se analizaron en un gel de agarosa junto con la correspondiente de la estirpe silvestre y se transfirieron a una membrana de nylon (apartados 2.5.5.3. y 2.5.8.1.). A continuación, la membrana fue hibridada usando como sonda los fragmentos *Bam* HI del pKW1188 de 1,71 y 1,3 kb correspondientes al DNA de *Synechocystis* (apartado 2.5.8.5.) (figura 18B). En el carril con el DNA de la estirpe silvestre apareció una banda de hibridación de 3,01 kb mientras que en el caso de las estirpes FG502 y KWCAT aparecieron dos bandas de hibridación de tamaños diferentes ya que la integración del pKW1188 introduce un punto de corte *Bam* HI ausente en el DNA de la estirpe silvestre. Estos resultados indicaron que las estirpes habían integrado la construcción en el cromosoma correctamente y que la segregación había sido completa. Después de retirar la sonda del filtro (apartado 2.5.8.5.), éste se sometió a una segunda hibridación con una prueba correspondiente al gen *cat* verificándose su presencia en las estirpes FG502 y KWCAT (figura 18B).

Las estirpes KWCAT y FG502 se cultivaron en medio conteniendo cloranfenicol (10 µg/ml) para probar su resistencia al antibiótico. La única estirpe capaz de crecer en presencia de cloranfenicol fue la FG502 indicando así que el gen *cat* se estaba expresando en esta estirpe y no en la KWCAT y por tanto, que el fragmento de 149 pb de la región 5' del gen *crtP* mantiene la actividad promotora del gen.

3.8.1.3. Estudio de la actividad CAT de FG502 y KWCAT en distintas condiciones de iluminación

Las estirpes FG502 y KWCAT de *Synechocystis* se cultivaron bajo dos intensidades luminosas diferentes (50 y 500 µE m⁻² s⁻¹) a lo largo del tiempo y se determinó la actividad CAT presente en extractos libres de células. Los cultivos se prepararon como se indica en el apartado 2.1.1.2. y se incubaron en las distintas condiciones durante 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 17 horas y 20 horas. Se prepararon extractos de cada muestra (apartado 2.2.1.) y se estimó la actividad CAT presente en los mismos como se describe en el apartado 2.4.1. (figura 19).

En el caso de la estirpe KWCAT en la que el gen *cat* carece de promotor, las actividades determinadas fueron muy bajas en todos los casos y no se apreció variación significativa de la misma entre las dos condiciones luminosas ensayadas. En el caso de la estirpe FG502 se apreció una inducción rápida de la actividad CAT en condiciones de alta luz detectándose un incremento de 3,5 veces en la actividad respecto de la inicial tras los 15 primeros minutos de tratamiento. Así pues, se concluye que la expresión del gen *crtP* está regulada por luz y que en el fragmento de DNA de la región 5' clonado delante del gen *cat* en la estirpe FG502, residen los elementos reguladores necesarios para provocar la activación del promotor que se observa frente a la luz de alta intensidad.

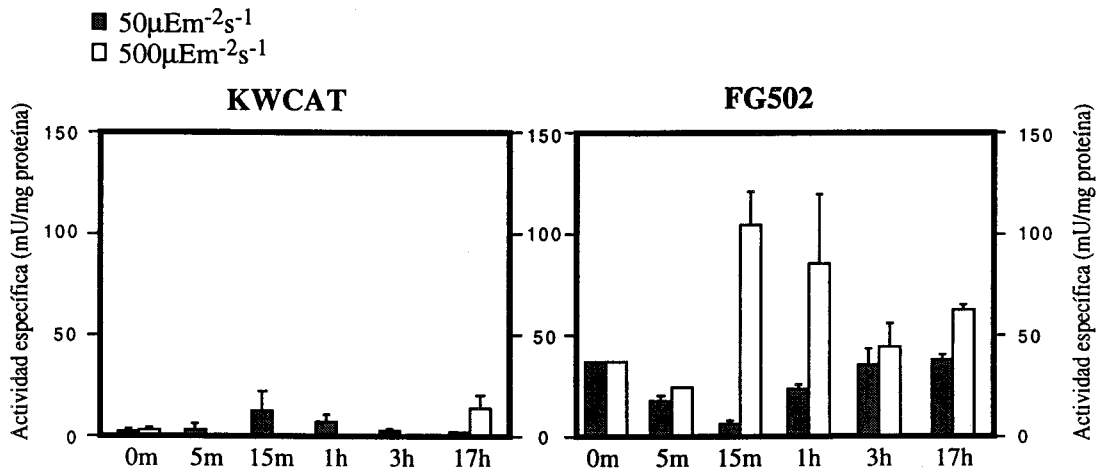


Figura 19. Actividad CAT de las estirpes FG502 y KWCAT.

Histograma donde se indican las actividades CAT de las estirpes FG502 y KWCAT sometidas a las distintas condiciones de iluminación que se indican. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes. En la parte inferior se indica el tiempo de iluminación en minutos (m) o en horas (h).

3.8.2. Influencia de la intensidad de luz sobre la expresión del gen *crtB* de *Synechocystis*

3.8.2.1. Estudio de los transcritos del gen *crtB* en distintas condiciones de iluminación

Se han estudiado los cambios en la expresión del gen *crtB* de *Synechocystis* a través del análisis de los mensajeros del gen cuando cultivos de esta cianobacteria se

pasan de oscuridad a distintas intensidades de luz. Para ello, el filtro con RNAs utilizado en el apartado 3.8.1.1. se sometió a hibridación usando como sonda el fragmento interno *Apa* I de 519 pb del gen *crtB*. La radiactividad presente en el filtro se cuantificó y normalizó respecto de los valores obtenidos para la hibridación con la sonda *rnpB* usada como control (figura 20).

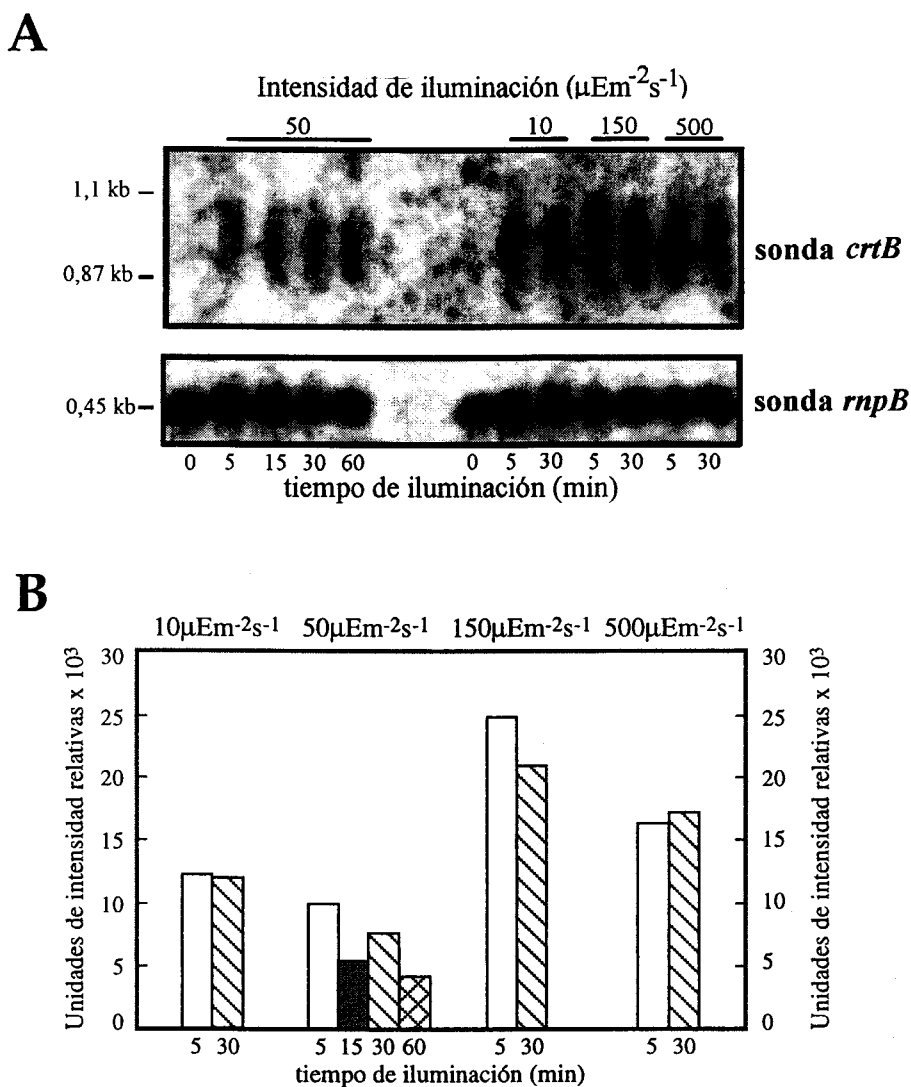


Figura 20. Inducción del mRNA del gen *crtB* por luz.

A) Hibridación de RNA total de *Synechocystis* en las condiciones de iluminación indicadas (ver figura 17) con sondas correspondientes a los genes *crtB* y *rnpB*. A la izquierda se indica el tamaño de los transcritos.

B) Histograma donde se muestra la abundancia relativa del mensajero de *crtB* en distintas condiciones de iluminación. La radiactividad contenida en el filtro del apartado A) fue cuantificada y las unidades de intensidad relativa fueron calculadas como $\text{cpm sonda } crtB / \text{cpm sonda } rnpB$ en cada carril.

En esta ocasión y frente a lo que ocurre con el gen *crtP*, no se detectó la presencia del transcrito en oscuridad (figura 20). Se observó una activación rápida del promotor bajo cualquiera de las intensidades ensayadas siendo suficientes 5 min de tratamiento para detectar el mRNA correspondiente. La respuesta mayor aparece bajo condiciones de iluminación moderadamente alta ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mientras que la menor se presenta con $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.8.2.2. Obtención de las estirpes FG602, FG603 y FG605

Para continuar el estudio de la expresión del gen *crtB* en *Synechocystis* se realizaron distintas construcciones similares a las desarrolladas con *crtP* fusionando fragmentos de la región 5' de *crtB* con un gen *cat* carente de promotor. Estas construcciones fueron introducidas en la estirpe silvestre de la cianobacteria y se estudió la actividad CAT presente en extractos de los transformantes cuando se cultivan en distintas condiciones de iluminación.

Se construyeron los plásmidos pFG400 y pFG402 (figura 21A) partiendo de otros dos denominados pMFaf y pMFag que llevan fragmentos del extremo 5' del gen *crtB* clonados entre los sitios *Kpn* I y *Hind* III del vector pGEM 7z-f (+). El inserto de pMFaf consta de 271 pb y se extiende desde la posición -192 a la +79 siendo la posición +1 el inicio de la transcripción de *crtB* (apartado 3.7.). El inserto del plásmido pMFag es de 150 pb y comprende de la posición -71 a la +79. En ambos casos el final del inserto coincide con un punto de restricción *Hind* III localizado en el interior del gen *crtB* y en el caso de pMFaf el inicio se encuentra dentro del gen *crtP*, próximo a su extremo 3'. Los plásmidos pMFaf y pMFag se cortaron con *Hind* III y se trataron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* para obtener extremos romos (apartado 2.5.7.). En los plásmidos así tratados se clonó el gen *cat* sin promotor obtenido como fragmento de restricción *Sma* I a partir del plásmido pJS133. Se seleccionaron las construcciones en las que el gen *cat* se encuentra orientado a favor de la transcripción de *crtB* y se denominaron pFG400 y pFG402 según derivasen de opMFaf o de pMFag respectivamente. En los dos casos las fusiones resultantes son transcripcionales.

Para introducir las construcciones de los plásmidos pFG400 y pFG402 en el cromosoma de *Synechocystis* se utilizó el plásmido pKW1188. Mediante la restricción

Apa I/*Nsi* I de pFG400 y pFG402 se obtuvieron dos fragmentos de DNA de 0,9 y 0,85 kb respectivamente que llevan las fusiones del extremo 5' de *crtB* con el gen *cat* (apartado 2.5.7.1.). Estos fragmentos se clonaron en pKW1188 cortado con *Hinc* II (apartado 2.5.7.2.). En el caso del plásmido derivado de pFG400 se obtuvo el plásmido pFG603 con el gen *cat* en la misma orientación que el gen *npt* del vector. En el caso de pFG402 se obtuvieron las dos orientaciones posibles dando lugar a los plásmidos pFG602 (*cat* en dirección opuesta a *npt*) y pFG605 (*cat* en la misma orientación que *npt*) (figura 21A).

Con los plásmidos pFG602, pFG603 y pFG605 se transformaron células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y se seleccionaron los transformantes en medio suplementado con kanamicina (apartado 2.5.2.1.). Después de varias rondas de segregación se extrajo DNA de los transformantes y de la estirpe silvestre (apartado 2.5.5.2.) y se sometió a restricción con la enzima *Bam* HI. Las restricciones se analizaron en un gel de agarosa, se transfirieron a una membrana de nylon y se sometieron a hibridación usando como sonda el fragmento de DNA de *Synechocystis* de pKW1188 (apartados 2.5.5.3. y 2.5.8.). Los resultados se muestran en la figura 21B. El DNA de todos los transformantes presenta dos bandas de hibridación como consecuencia de la introducción de un punto de corte *Bam* HI tras la integración de pKW1188, mientras que el DNA de la estirpe silvestre donde ese punto de restricción no existe, presenta una banda única. Estos resultados indicaron que las construcciones se habían integrado correctamente en el cromosoma de *Synechocystis* y que la segregación fue completa.

Con el fin de determinar si los fragmentos del extremo 5' de *crtB* tenían actividad promotora se analizó la resistencia a cloranfenicol de las estirpes FG602, FG603 y FG605. La única estirpe capaz de crecer con antibiótico fue la FG603 lo que indicaba que el gen *cat* se estaba expresando y que la región de DNA a partir de la posición -192 de *crtB* es suficiente para actuar como promotor. Por otra parte, las estirpes FG602 y FG605, que sólo llevan hasta la posición -71 del extremo 5' de *crtB*, no presentan expresión significativa del gen *cat* ya que no crecen en presencia de cloranfenicol, por lo que se deduce que la región comprendida entre las posiciones -192 y -71 de *crtB* es necesaria para la expresión de dicho gen.

También se calcularon las actividades CAT de extractos de las estirpes FG602, FG603 y FG605. Se prepararon los extractos libres de células (apartado 2.2.1.) a partir de cultivos de ambas estirpes incubados en condiciones de iluminación normales

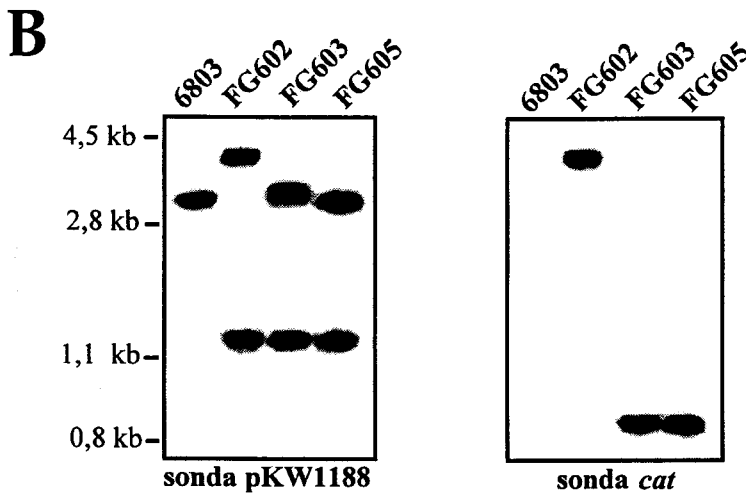
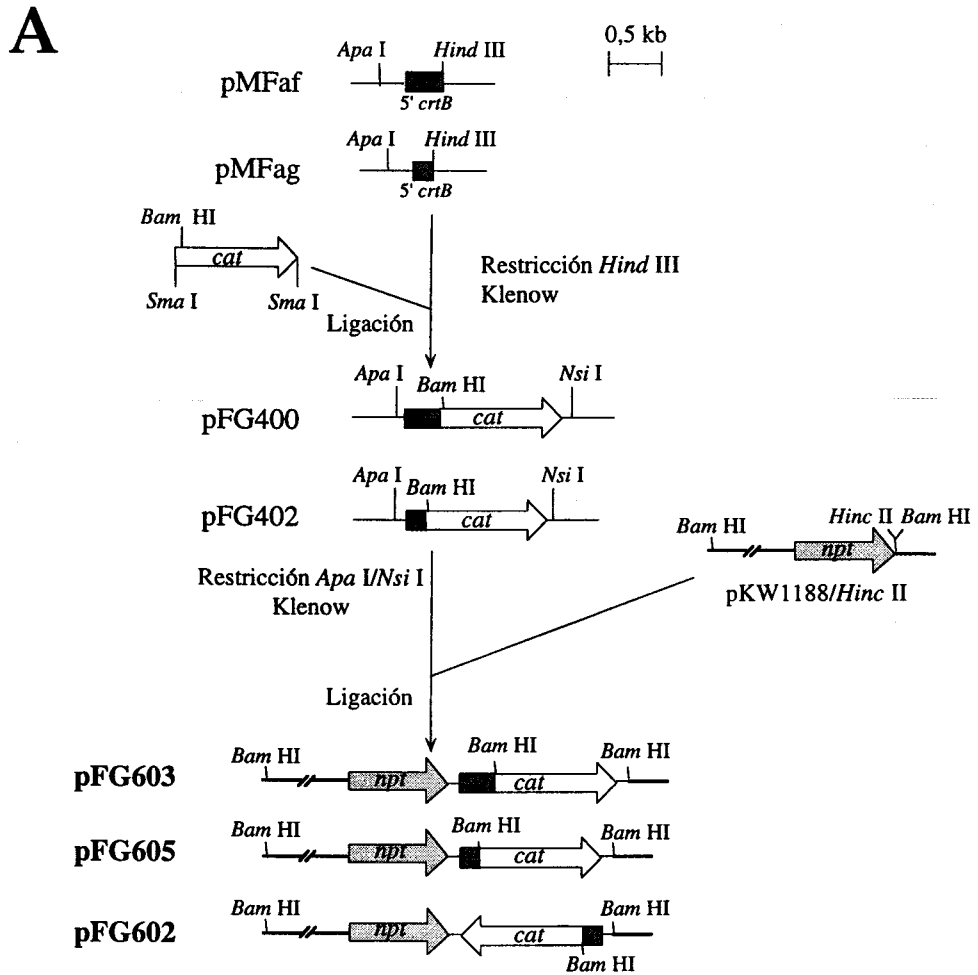


Figura 21. Construcción de las estirpes *FG602*, *FG603* y *FG605* de *Synechocystis*.
 A) Esquema de las construcciones enviadas al cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en las estirpes *FG602*, *FG603* y *FG605*.
 B) Hibridación de DNA total de las estirpes silvestre (6803), *FG602*, *FG603* y *FG605* cortado con *Bam* HI con una sonda de *pKW1188* y otra del gen *cat*. El tamaño de los marcadores se indica a la izquierda.

($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se estimaron las actividades CAT (apartado 2.4.1.). Sólo se pudo detectar actividad en el extracto de la estirpe FG603.

3.8.2.3. Expresión del gen *cat* en distintas condiciones de iluminación en la estirpe FG603

Se ha estudiado la expresión del gen *cat* en la estirpe FG603 cuando se cultiva en distintas condiciones de iluminación. Para ello, las estirpes FG603 y la KWCAT (apartado 3.8.1.2.) se cultivaron a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hasta que la DO a 580 nm fue de 1,0. Este cultivo se usó como preinóculo de otros que se incubaron a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante distintos tiempos como se describe en el apartado 2.1.1.2. Se recogieron muestras de 20 ml en cada uno de los puntos y se prepararon extractos libres de células (apartado 2.2.1.) a partir de los cuales se determinó la actividad CAT según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.4.1.). En el caso de la estirpe KWCAT se estimó que la actividad CAT permanece invariable independientemente de las intensidad luminosa, mientras que en los extractos de la estirpe FG603 se detectó un incremento transitorio en la actividad a los 15 minutos de tratamiento en alta luz (figura 22).

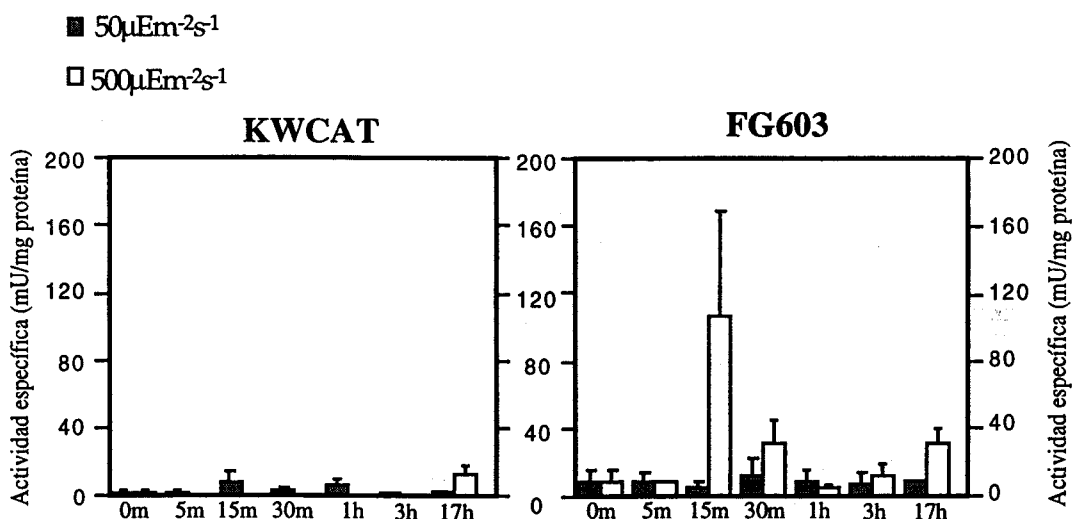


Figura 22. Actividad CAT de las estirpes FG603 y KWCAT.

Histograma donde se indican las actividades CAT de las estirpes FG603 y KWCAT cultivadas en las condiciones de iluminación que se indican. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes. Se indica el tiempo de iluminación en minutos (m) o en horas (h).

3.9. CLONACION DE LAS FASES DE LECTURA ABIERTA slr0088, sll0033 Y slr0940 DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

Las fitoeno desaturasas de cianobacterias y plantas (CrtP) catalizan la introducción de dos dobles enlaces para producir ζ -caroteno y no presentan homología con las fitoeno desaturasas de tipo bacteria (CrtI) que introducen tres o cuatro dobles enlaces rindiendo neurosporeno o licopeno respectivamente (Sandmann, 1994). Por tanto, en el caso de cianobacterias y de plantas se requiere una segunda enzima para la producción de licopeno a partir de ζ -caroteno (ζ -caroteno desaturasa). La ζ -caroteno desaturasa de plantas (CrtQ) es homóloga a las desaturasas de tipo CrtP (Albrecht *et al.*, 1995). Curiosamente, la ζ -caroteno desaturasa de *Anabaena*, única cianobacteriana identificada hasta la realización de este trabajo, es homóloga a las desaturasas de tipo CrtI o bacterianas (Linden *et al.*, 1995).

Por otra parte, el conocimiento de la secuencia del genomio de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 nos permitió buscar ORFs (fases de lectura abierta) presuntamente implicadas en la síntesis de carotenoides que no hubieran sido caracterizadas hasta la fecha. De esta forma identificamos dos de ellas, slr0088, sll0033 que presentaban una homología significativa con los genes *crtI* de las desaturasas de fitoeno de tipo bacteria (36% y 26% de identidad respectivamente) y una tercera, slr0940, con una identidad del 65% con el gen *crtQ* de *Arabidopsis*. Previamente nosotros habíamos clonado el gen *crtP* de *Synechocystis* que codifica una desaturasa de fitoeno de tipo planta (Martínez-Férez y Vioque, 1992). Aunque la ORF candidata con más firmeza a codificar la ζ -caroteno desaturasa de *Synechocystis* era slr0940 existía el precedente del gen *crtQ* de *Anabaena*, homólogo a *crtI* más que a genes *crtP* cianobacterianos o de plantas (Linden *et al.*, 1994). Por tanto, era razonable pensar que cualquiera de las tres ORFs de *Synechocystis* codificase la ζ -caroteno desaturasa de este microorganismo, lo que nos condujo a abordar su clonación y caracterización.

Las fases abiertas de lectura denominadas slr0088, sll0033 y slr0940 identificadas en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 fueron clonadas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizaron tres reacciones separadas una de las cuales contenía DNA genómico de *Synechocystis* como molde y los oligonucleótidos slr0088R y slr0088F como cebadores de la síntesis de DNA. En una segunda se usó el mismo DNA como molde y como cebadores los oligonucleótidos sll0033R

y slr0033F. La tercera se realizó con el mismo molde genómico y los oligonucleótidos slr0940R y slr0940F (apartado 2.5.9.). El producto de las reacciones se analizó en electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.5.5.3.) y en todos los casos se detectó una banda del tamaño esperado (1,5 kb para slr0033, 1,63 kb para slr0088 y 1,47 kb para slr0940). Las bandas obtenidas fueron purificadas del gel (apartado 2.5.5.4.). Posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI y se ligaron al vector de expresión pTrc99A tratado con las mismas enzimas (apartado 2.5.7.). De esta manera se generaron los plásmidos pTRC0033, pTRC0088 y pTRC0940 en los que la expresión de las distintas ORFs queda bajo el control del promotor *trc* inducible por IPTG. En todos los casos las proteínas recombinantes esperadas llevarían 2 aminoácidos adicionales en su extremo amino:

pTRCRT-O	MEFITTD... <i>versus</i> MITTD...
pTRC0033	MEFTVSP... <i>versus</i> MTVSP...
pTRC0940	MEFRVAL... <i>versus</i> MRVAL...

3.10. ESTUDIO DE LA FASE DE LECTURA ABIERTA slr0088

3.10.1. Expresión de la ORF slr0088 en *E. coli*

El primer paso para determinar si la fase de lectura abierta slr0088 codificaba en realidad alguna proteína consistió en intentar su expresión en *E. coli*. Con tal fin se cultivaron células de la estirpe DH5 α portadoras de los plásmidos pTRC0088 o pTrc99A en medio líquido como se describe en el apartado 2.1.2.2., añadiendo IPTG para inducir la expresión de la ORF clonada en pTRC0088. Las células de ambos cultivos tanto inducidas como no inducidas fueron recogidas y resuspendidas directamente en tampón de carga (apartado 2.6.1.). Las proteínas presentes en tales extractos crudos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (apartado 2.6.1.) (figura 24).

En los geles se observaba una proteína de 59 kDa presente en el extracto de la estirpe DH5 α (pTRC0088) inducido con IPTG y ausente en el extracto no inducido de la misma estirpe así como en los de la estirpe DH5 α (pTrc99A) tanto inducido como sin inducir. El tamaño de esta proteína concordaba con el esperado para el producto de expresión de la ORF slr0088.

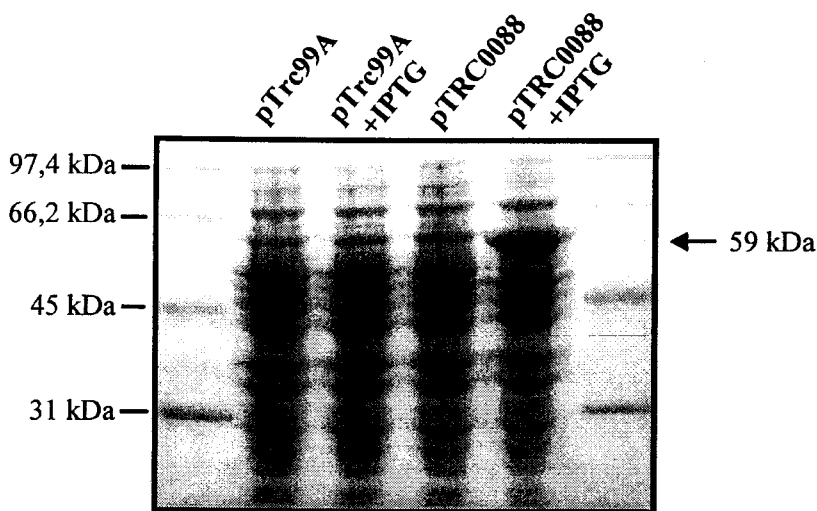


Figura 24. Detección del producto proteico de la ORF slr0088 de *Synechocystis* en extractos crudos de *E. coli*. La flecha indica la banda presente en el extracto de células de *E. coli* DH5 α (pTRC0088) inducido con IPTG que no aparece en el resto de extractos.

Para determinar la función de la proteína expresada se realizaron experimentos de complementación *in vivo* en *E. coli*. El plásmido pTRCRT-O se introdujo en células de la estirpe JM101 en combinación con varios plásmidos derivados del vector pACYC184 (llevan un origen de replicación compatible con el de pTRCRT-O) que permiten la acumulación de diferentes carotenoides (tabla 2). Los transformantes se cultivaron y recolectaron como se describe en el apartado 2.1.2.2. y se determinó el contenido en carotenoides según el apartado 2.6.3. (tabla 4).

TABLA 4. Carotenoides acumulados en *E. coli* en presencia de pTRC0088 junto con varios plásmidos que contienen genes para la biosíntesis de carotenoides.

Plásmido(s)	pTRC0088	Carotenoides acumulados
pACCRT-EB	-	Fitoeno
pACCRT-EB	+	Fitoeno
pACCRT-EBP	-	ζ -caroteno
pACCRT-EBP	+	ζ -caroteno
pACCRT-EBIRc+pRKCRT-C	-	Hidroxi-neurosporeno
pACCRT-EBIRc+pRKCRT-C	+	Hidroxi-neurosporeno
pACCAR16 Δ crtX	-	β -Caroteno
pACCAR16 Δ crtX	+	Equinenona, (Cantaxantina), y β -Caroteno

Los carotenoides se extrajeron como se describe en Materiales y Métodos a partir de cultivos de células de *E. coli* portadoras de los plásmidos que se indican.

En células que acumulan fitoeno (portadoras de pACCRT-EB), 1-hidroxi-neurosporeno (portadoras de pACCRT-EBI_{Rc} y pRKCRT-C), y ζ -caroteno (portadoras de pACCRT-EBP) no se detectó ninguna actividad desaturasa cuando se expresó el producto de la ORF slr0088, esto es, no se detectaron productos de desaturación de fitoeno, ζ -caroteno o 1-hidroxi-neurosporeno. En principio estos resultados sugieren que tal producto no es una caroteno desaturasa, como lo son las enzimas codificadas por los genes *crtD* y *crtI*, y que tampoco está relacionado con la enzima ζ -caroteno desaturasa de *Anabaena*. Aunque, por otra parte, podría tratarse de una desaturasa funcional en *Synechocystis* pero no en *E. coli* ya que a pesar de que la proteína se sintetice puede requerir factores adicionales no presentes en estas células. Sin embargo, cuando la proteína codificada por pTRC0088 fue expresada en células JM101 productoras de β -caroteno (portadoras de pACCRT16 Δ crtX) se detectó la presencia de equinenona y de pequeñas cantidades de cantaxantina (figura 25).

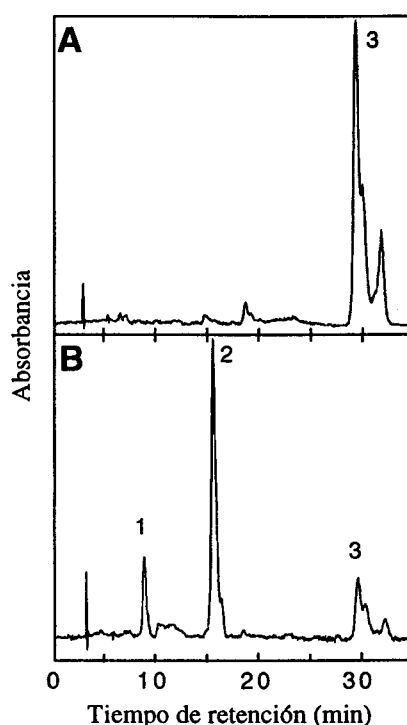


Figura 25. Biosíntesis de equinenona en *E. coli* por el producto del gen *crtO*. Análisis por HPLC de los carotenoides extraídos de células JM101 de *E. coli* portadoras del plásmido pACCAR16 Δ crtX (A) y de los plásmidos pACCAR16 Δ crtX + pTRC0088 (B). Los carotenoides identificados fueron cantaxantina (1), equinenona (2) y β -caroteno (3).

Este resultado indicaba que la ORF slr0088 codificaba la enzima β -caroteno cetolasa y que, por tanto, se correspondía realmente con un gen de la ruta biosintética de carotenoides. A este nuevo gen se le denominó *crtO* y el plásmido pTRC0088 pasó a denominarse pTRCRT-O.

Las β -caroteno cetolasas caracterizadas hasta este momento (tipo CrtW) (Misawa *et al.*, 1995; Kajiwara *et al.*, 1995; Lotan y Hirschberg, 1995) catalizan la síntesis de cantaxantina con muy poca o ninguna acumulación de equinenona, a través de la introducción de 2 grupos OH de manera simétrica en la molécula de β -caroteno. Sin embargo, la enzima codificada por *crtO* (tipo CrtO) cataliza la introducción de sólo 1 grupo OH sintetizándose equinenona fundamentalmente (figura 26), situación que se correlaciona con lo que ocurre en *Synechocystis* donde se acumula este pigmento y no cantaxantina.

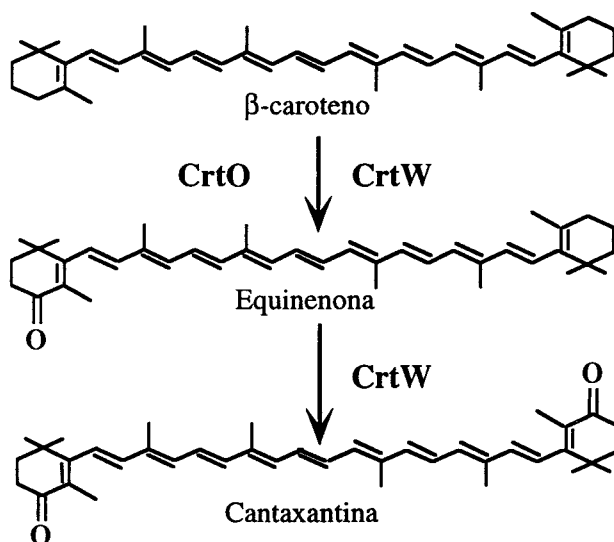


Figura 26. Reacciones catalizadas por los dos tipos de cetolasas de β -caroteno que se han caracterizado.

3.10.2. Inactivación de *crtO* en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para probar la función de *crtO* en *Synechocystis* se inactivó este gen por la inserción de un gen de neomicina fosfotransferasa (*npt*) de Tn5.

El plásmido pRL161 se digirió con *Hinc* II y se aisló el fragmento de 1,3 kb portador del gen *npt*. Por otra parte, el plásmido pTRCRT-O se trató con *Cla* I y con el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I de *E. coli* y se ligó al gen *npt* aislado (apartado 2.5.7.). De esta manera se sustituyó un fragmento interno *Cla* I de 121 pares de bases (pb) de *crtO* por el gen *npt*. Se obtuvieron dos plásmidos, uno de ellos con el gen *npt* orientado a favor de la expresión de *crtO* (pSLR8800) y otro con la orientación contraria (pSLR8801) (figura 27A). Con el plásmido pSLR8801 se transformó la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y se seleccionaron transformantes en medio BG11 suplementado con kanamicina (apartado 2.5.2.1.).

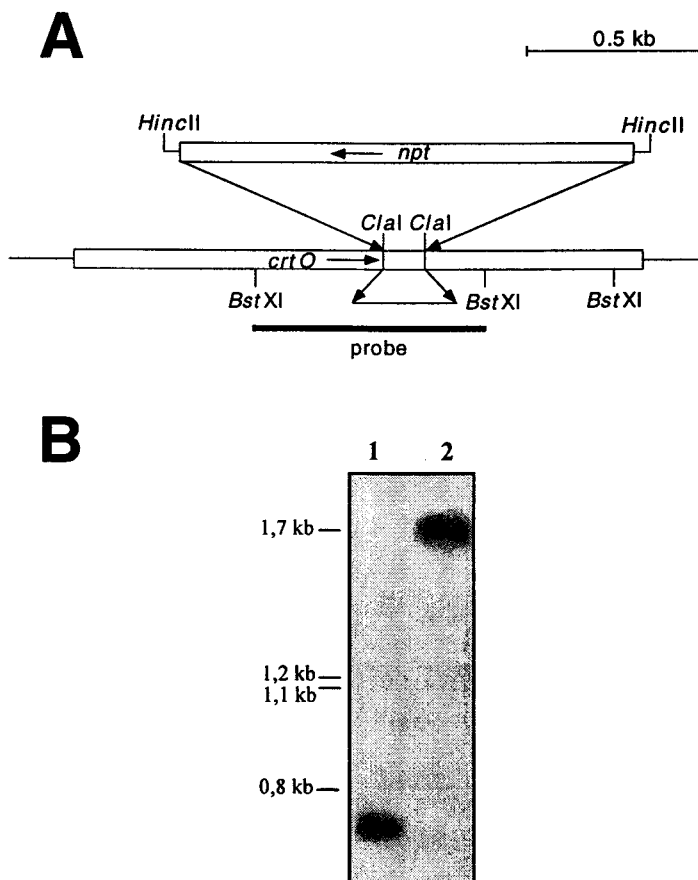


Figura 27. Inactivación del gen *crtO*.

A) Estrategia de interrupción del gen *crtO* por inserción del gen *npt*.

B) Análisis por hibridación del DNA genómico de la estirpe silvestre de *Synechocystis* (carril 1) o de la estirpe *crtO*⁻ (carril 2). El DNA se digirió con *Bst* XI y se hibridó con el fragmento *Bst* XI interno de *crtO*. El tamaño de los marcadores se indica a la izquierda en kilobases.

Tras varias rondas de segregación en medio con kanamicina se extrajo DNA de un transformante y se digirió con *Bst* XI. Los fragmentos se separaron en gel de agarosa, se transfirieron a un filtro de nylon y se hibridaron usando como sonda un fragmento interno *Bst* XI de 658 pb (apartados 2.5.8.1. y 2.5.8.5.). Como se muestra en la figura 27B, la única banda de hibridación en el DNA de *crtO*⁻ tiene un tamaño de 1,7 kb frente a las 0,6 kb de la banda silvestre lo que indica que la copia de *crtO* mutada se segregó completamente.

Las colonias de la estirpe *crtO*⁻ presentaban un aspecto similar a las de la estirpe silvestre y su viabilidad no parecía verse afectada. El contenido de carotenoides de la estirpe *crtO*⁻ fue determinado (apartado 2.6.3.) y comparado con el de la estirpe silvestre (figura 28).

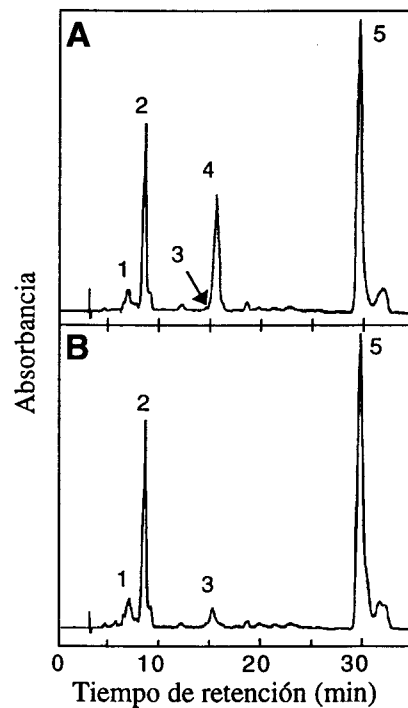


Figura 28. Análisis por HPLC de los carotenoides presentes en la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803 y en la estirpe *crtO*⁻.

En A se muestra el perfil de elución de los carotenoides de la estirpe silvestre y en B los de la estirpe *crtO*⁻. Los carotenoides identificados fueron mixoxantofila (1), zeaxantina (2), β -criptoxantina (3), equinenona (4) y β -caroteno (5).

Los principales carotenoides identificados en la estirpe silvestre fueron mixoxantofila, zeaxantina, equinenona y β -caroteno. En la estirpe *crtO* no se detectó la presencia de equinenona mientras que el contenido en el resto de pigmentos era prácticamente igual que el de la estirpe silvestre. En ninguna de las dos estirpes se detectó la presencia de cantaxantina incluso usando un sistema de HPLC diferente optimizado para la separación entre cantaxantina y zeaxantina (Breitenbach *et al.*, 1996).

Este resultado apoya los anteriores indicando que *crtO* es necesario para la síntesis de equinenona en *Synechocystis*, y que codifica una β -caroteno cetolasa que actúa asimétricamente para producir equinenona en vez de cantaxantina, a diferencia de lo que sucede con las β -caroteno cetolasas caracterizadas previamente (Misawa *et al.*, 1995; Kajiwara *et al.*, 1995; Lotan y Hirschberg, 1995).

3.10.3. Análisis de la secuencia de *crtO*

El análisis de la secuencia del gen *crtO* (figura 29) pone de manifiesto su homología con los genes *crtI* de desaturasas bacterianas así como la falta de homología con otras cetolasas. Este gen también contiene un sitio de unión a nucleótidos en el extremo amino similar al que aparece en las fitoeno desaturasas.

Las tres cetolasas de β -caroteno previamente caracterizadas, dos de bacterias marinas y una de un alga verde, son homólogas entre sí. Se pueden alinear e identificar cuatro regiones conservadas (Kajiwara *et al.*, 1995). También en estas tres enzimas se han encontrado dos grupos de residuos de histidina que se conservan y que estarían involucrados en la unión a Fe^+ el cual actúa como cofactor al menos *in vitro* (Fraser *et al.*, 1991). Hemos intentado localizar en *crtO* agrupaciones de histidinas equivalentes o regiones que presenten similitud con cualquiera de los cuatro dominios conservados en las otras cetolasas pero no se observa ningún parecido significativo. Por otra parte, estas cetolasas no contienen un sitio de unión a nucleótidos en el extremo amino a diferencia de lo que ocurre con *crtO*. Así pues, podemos decir que *crtO* codifica una enzima completamente diferente que está relacionado filogenéticamente con desaturasas de carotenoides en vez de con cetolasas.

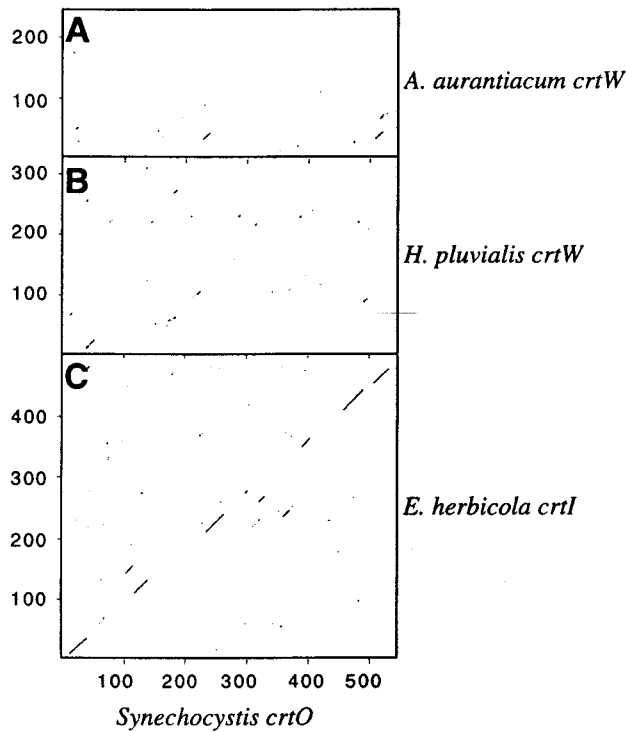


Figura 29. Esquema de similaridad de la cetolasa de β -caroteno de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con otras proteínas.

La secuencia de la cetolasa de β -caroteno de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se comparó con las secuencias de los correspondientes enzimas de *Haematococcus pluvialis* (A), *Agrobacterium auranticum* (B) y con la fitoeno desaturasa de *Erwinia herbicola* (C). La similaridad se calculó con una ventana de 21 aminoácidos y una identidad de 12 usando el programa Compare del paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984).

3.11. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA β -CAROTENO CETOLASA DE *Synechocystis*

Hemos estudiado la actividad *in vitro* de la β -caroteno cetolasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (apartado 2.4.2.). Extractos de células de *E. coli* que expresan *crtO* (fuente de enzima) se ensayaron con homogenados de células de *E. coli* que acumulan β -caroteno (fuente de sustrato) en presencia de NADPH. Así se demostró que los primeros convierten β -caroteno en equinenona con una tasa de conversión del 12% (tabla 5). Se requiere NADPH para la reacción. También se observó un 2% de conversión de equinenona en cantaxantina indicando que la especificidad del extracto crudo por el

sustrato no es absoluta. Los productos de la reacción, equinenona y cantaxantina, fueron identificados por co-cromatografía con estándares purificados y por sus espectros de absorción (figura 30).

TABLA 5. Conversión *in vitro* de β -caroteno por homogenados de células de *E. coli* que expresan *crtO*.

Extractos	Contenido en carotenoides (ng) después de la reacción		
	β -Caroteno	Equinenona	Cantaxantina
pACCAR Δ 16crtX	510	0	0
pACCAR Δ 16crtX + pTRCRT-O	429	62	9

Los ensayos *in vitro* de la cetolasa se realizaron como se describe en Materiales y Métodos con extractos de células de *E. coli* que llevaban el plásmido pACCAR16 Δ crtX o con una mezcla de este extracto y de otro de células de *E. coli* que llevaban el plásmido pTRCRT-O.

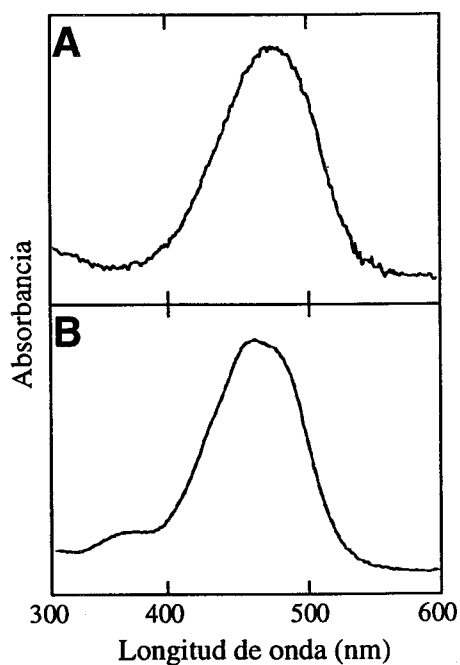


Figura 30. Espectro de absorción de los productos formados *in vitro* por el producto del gen *crtO* a partir de β -caroteno. A) cantaxantina; B) equinenona.

3.12. CARACTERIZACION DEL MUTANTE *crtO*⁻

3.12.1. Efecto de la intensidad de luz

3.12.1.1. Efecto de la intensidad de luz sobre el crecimiento y la actividad fotosintética

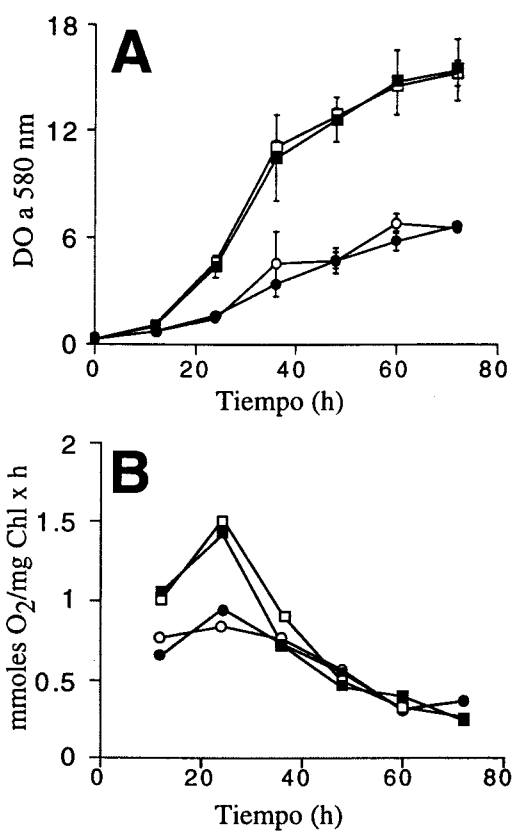


Figura 31. Curva de crecimiento (A) y desprendimiento de oxígeno (B) de las estirpes silvestre y *crtO*⁻ de *Synechocystis* cultivadas en distintas condiciones de iluminación.

Los datos de la estirpe silvestre se representan por símbolos blancos y los de la estirpe *crtO*⁻ por símbolos negros. Las condiciones de iluminación utilizadas fueron 50 μE m⁻² s⁻¹ (círculos) y 250 μE m⁻² s⁻¹ (cuadrados).

Los datos corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Hemos demostrado que es posible segregar totalmente un mutante carente de *crtO* funcional y que este mutante no sintetiza equinenona. En condiciones normales de crecimiento, la estirpe *crtO*⁻ es viable y no parece que se requiera equinenona para la supervivencia de las células.

El papel protector de los carotenoides frente a altas radiaciones de luz visible es bien conocido (Siefermann-Harms, 1987; Demming-Adams y Adams, 1992). Para determinar si la equinenona tenía algún papel en fotoprotección decidimos estudiar la viabilidad de la estirpe mutante cultivada en distintas condiciones de intensidad lumínica. Con este fin se cultivaron las estirpes silvestre y *crtO*⁻ en condiciones normales de iluminación ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y bajo alta intensidad de luz ($250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 3 días (apartado 2.1.1.2.). Se tomaron muestras de estos cultivos cada 12 h y se determinó la turbidez del cultivo (DO a 580 nm) como indicador del crecimiento y la producción de O₂ como indicador de la tasa fotosintética (apartado 2.6.9.) (figura 31). Tanto la estirpe silvestre como la mutante presentan tasas similares de crecimiento a baja y a alta intensidad lumínica. De la misma manera, no se aprecian diferencias en cuanto a la tasa fotosintética entre ambas estirpes cultivadas en iguales condiciones de iluminación.

Estos resultados indican que la carencia de equinenona no parece afectar al crecimiento o a la actividad fotosintética bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

3.12.1.2. Efecto de la intensidad de luz sobre el contenido en carotenoides

Se ha descrito la acumulación de una xantofila, la zeaxantina, en células de *Synechococcus* sp. PCC 7942 cultivadas en condiciones de alta iluminación (Masamoto y Furukawa, 1997). Por tanto, tras determinar que la intensidad de luz no afectaba ni a la viabilidad de las células de *Synechocystis* carentes de equinenona ni a su capacidad para realizar fotosíntesis decidimos analizar el contenido en carotenoides de las estirpes silvestre y *crtO*⁻ cultivadas en las mismas condiciones que en el apartado anterior. Para ello, ambas estirpes se cultivaron de la manera descrita y se tomó una muestra a las 72 h de la que se realizaron, por una parte, los espectros de absorción de células enteras (apartado 2.6.6.) y por la otra, la extracción y análisis de los carotenoides por HPLC (apartado 2.6.3.). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32 y en la tabla 6.

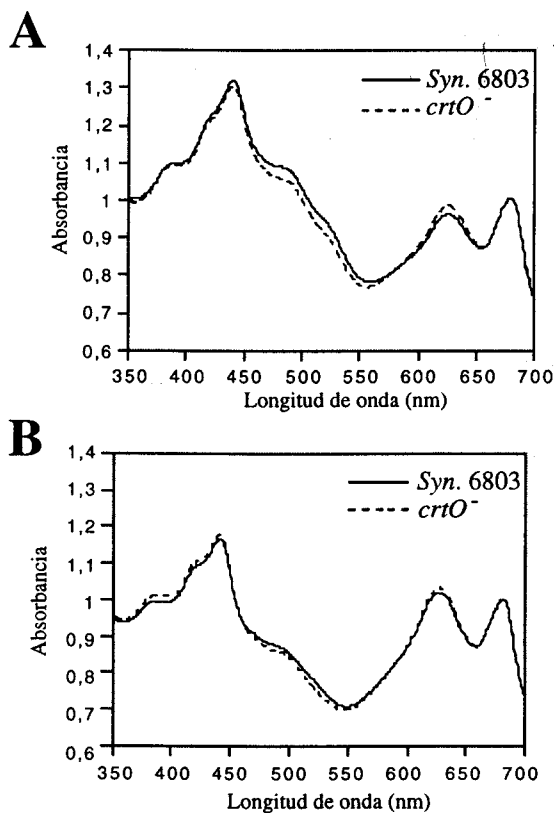


Figura 32. Espectros de células enteras de las estirpes *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *crtO*⁻ cultivadas en distintas condiciones de iluminación.

Los espectros se han normalizado respecto a la absorbancia a 680 nm correspondiente a la banda Soret de la clorofila.

A) Espectro de células cultivadas a 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

B) Espectro de células cultivadas a 250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

TABLA 6. Contenido en carotenoides (mg carotenoides / g peso seco) de las estirpes silvestre (6803) y *crtO*⁻ de *Synechocystis* cultivadas durante 72 h bajo dos intensidades de luz diferentes.

	6803		<i>crtO</i> ⁻	
	50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Mixoxantofila	0,6	0,57	0,96	0,24
Zeaxantina	1,43	0,88	3,35	0,33
Mixol	0,53	0,28	0,18	0,06
Equinenona	3,07	1,32	0	0
β -Criptoxantina	0	0	0,54	0,07
β -Caroteno	6,69	2,22	8,22	0,87
Carotenoides totales	12,32	5,27	13,25	1,57

Se indican las intensidades luminosas utilizadas en el cultivo de las células.

Los espectros de células enteras mostraron pocas diferencias entre las estirpes silvestre y *crtO⁻* cultivadas a $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ aunque a $250 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ la curva correspondiente a la estirpe silvestre, aparece por encima de la correspondiente a la estirpe mutante en la región en la que absorben los carotenoides (de 425 nm a 580 nm aproximadamente). Cuando se analizaron los carotenoides una vez aislados y separados por HPLC se detectaron variaciones entre las dos estirpes en todas las condiciones utilizadas. Así, a $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ el contenido total de pigmentos es ligeramente superior en la estirpe mutante y este aumento se corresponde con un incremento en el contenido de todos los carotenoides presentes a excepción del mixol. Además se detectó la presencia de β -criptoxantina (precursor de la zeaxantina) ausente en la estirpe silvestre. Por otra parte, en condiciones de alta intensidad de iluminación ambas estirpes presentan una reducción en el contenido de todos los carotenoides, si bien el descenso es más acusado en el caso de la estirpe *crtO⁻* en la que el contenido total se reduce un 88% respecto del valor obtenido a $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, frente a la reducción del 57,2% experimentada por la estirpe silvestre.

Por tanto, podemos decir que la ausencia de equinenona determina un cambio en el contenido de carotenoides en la estirpe *crtO⁻* respecto de la estirpe silvestre aunque este cambio no afecta a la viabilidad de las células al menos en las condiciones utilizadas en este experimento (figura 31).

3.12.2. Efecto de la luz ultravioleta

En cianobacterias se ha descrito que los carotenoides tienen un papel protector frente a irradiación con UV-A (Buckley y Houghton, 1976; Paerl, 1984). Recientemente se ha relacionado la equinenona con protección frente a UV-B en la cianobacteria *Nostoc commune* (Ehling-Schulz *et al.*, 1997). Ante estos datos nos planteamos estudiar si la equinenona tenía alguna de estas funciones en *Synechocystis*. Para ello las estirpes *crtO⁻* (deficiente en la síntesis de equinenona) y silvestre se cultivaron e irradiaron con luz ultravioleta como se describe en el apartado 2.1.1.2. Diferentes diluciones de estas preparaciones se inocularon en medio sólido para determinar la viabilidad de acuerdo al número de colonias presentes en las placas. Cuando las células se sometieron a irradiación con una longitud de onda de 312 nm y probando distintas intensidades de la misma variando la distancia a la fuente emisora de U.V. (apartado 2.1.1.2.), así como ensayando distintos tiempos de irradiación (1, 10, 15 y 20 min), se observaba en todos los

casos la misma tasa de supervivencia para ambas estirpes. Así, con la menor intensidad de U.V. probada (máxima distancia a la lámpara de U.V.) la viabilidad se ve afectada a los 10 min de tratamiento observándose un 37,7% de supervivencia en el caso de la estirpe silvestre y un 39,6% en el caso de la estirpe *crtO*⁻, mientras que con tiempos mayores de irradiación la supervivencia fue menor del 1% en ambos casos. En el caso de que la distancia a la fuente de U.V. se redujese a la mitad la supervivencia era menor del 1% en todos los tiempos probados para las dos estirpes. Por tanto, no parece que la equinenona proteja frente a la luz U.V. al menos en nuestras condiciones experimentales.

3.13. ANALISIS DE LA ORF sll0033

3.13.1. Análisis de la secuencia de sll0033

El producto del gen sll0033 tiene una ligera similaridad con las fitoeno desaturaras de tipo CrtI (23% de identidad con *crtI* de *Rhodobacter*). Por otra parte, esta proteína también presenta varios dominios de similitud con la secuencia aminoacídica deducida para *crtQ-1* de *Anabaena* incluyendo el sitio de unión a nucleótidos. La comparación de secuencias entre los productos de los genes sll0033 de *Synechocystis* y *crtQ-1* de *Anabaena* se muestran en la figura 33.

	=====	
<i>Synechocystis</i> slr0033	MTVSPSYDAIVIGSGIGGLVTATQLVSKGLKVLVLERYLIPGGSAGYFEREGYRFDVGAS	60
<i>Anabaena crtQ-1</i>	---MSKKVAIVGAGPGGLATAIRLAGLGYQVEIFEAAERVGGMRGFEVDSYAFDTGPT	56
	* . . . * .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	MIFGFGDRGTTNLLTRALAAVQQALETLPDPVQIHYHLPGGLDPKVHREYEAFLQELIAK	120
<i>Anabaena crtQ-1</i>	-ILQLP-HLYKELFEEAGLNFADYVQLKRLPEYTRLKFWDGTQLDITSDLQSFKTQLATL	114
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	FPQEAQGIIRRFYDECWQVFNCLNTEMLLSLEEPYLMRVFFQHPGACLGLVKYLP-QNVG	179
<i>Anabaena crtQ-1</i>	RSDLPLAFDRWYSEHIRKYE-LGYKPYLAGPARSIFG---YLRPDDLKFLSFRPWENLY	170
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	DIARRHIQDPDLL-----KFIDMECYCWSVVPADLTPMINAGMVFSDRHYGGINYPKG	232
<i>Anabaena crtQ-1</i>	QHFWRFFQDERLVYDLRYP SKYLGMH----PTVASSVFSLI-PFLEFSQ----GVWHPVG	221
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	GVGQIAESLVAGLEKFGGKIRYGARVTKIIQENNAIGVELANGEKIYGRRIVSNAIWRD	292
<i>Anabaena crtQ-1</i>	GFRALAQGLANAAQDLGVKIHLSFVHQIWIWIDQGVRLGELADASRHQFTVVINADF--	279
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	TFGALTGDQPLPGKEK-RWRRN---YQOSPSFLSLHLGVEADLLPEGTECHHILLEDW-	346
<i>Anabaena crtQ-1</i>	---AYAVRHLLPTSARGRYTDMKLGOMQFSCSTFMLYLGINRRY--EDLPHHQIYLSdni	334
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	-----DDLEKEQGTIFVSIPTLLDPSLAPDGYHIIHTFTPSWLESWQNLSPQEYE	396
<i>Anabaena crtQ-1</i>	RRLERFWVDDSDALDETDPPFYVCNPTIIDPSNAPAGHSTLFLVLPVPINTSY---AVDWD	390
	* .	
<i>Synechocystis</i> slr0033	AKKEADSGKLIDRLEAI-FPGLDRALDYMIEIGTFRSH-RRFLGRQNGTYGPIPRRRLPGL	454
<i>Anabaena crtQ-1</i>	IKQKSYTDFILKRLHLLGYHNIHQHIVTQSCYTAQSWLDDYRVHLGAVFNLSHNLQGLP	450
	* . . . * .	

```

Synechocystis slr003  LPMPFNRTAIPGLYCVGDSTFPGQGLNAVAFSGFACAHRLAVDLGVR-- 501
Anabaena crtQ-1      FRPPIRSENIAGLYWIGGAVHPGSGLLTILEASRSAAGFIHQDFASTGS 499
                    *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

Figura 33. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida para el gen sll0033 de *Synechocystis* y para el gen *crtQ-1* de *Anabaena*.

Los residuos idénticos en las secuencias se indican por un asterisco y los residuos similares por un punto. El dominio de unión a nucleótidos se indica por una línea doble sobre las secuencias.

3.13.2. Expresión de sll0033 en *E. coli*

El producto de la ORF sll0033 se intentó expresar en células de *E. coli* portadoras de pTRC0033. Se cultivaron células DH5 α portadoras de pTRC0033 o pTrc99A en presencia y en ausencia de IPTG (apartado 2.1.2.2.), se recogieron y se resuspendieron en tampón de carga (apartado 2.6.1.). Estos extractos crudos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS para separar las proteínas presentes (apartado 2.6.1.). No se observó diferencia alguna en el patrón de bandas de proteínas en ningún caso. Este resultado parecía indicar que o bien las células portadoras de pTRC0033 no codificaban ninguna proteína nueva respecto de las portadoras de pTrc99A, o bien que lo hacían en cantidades tan pequeñas que no se detectaban en los geles de electroforesis en las condiciones utilizadas. Ante esta última posibilidad decidimos realizar análisis de complementación *in vivo* con células JM101 portadoras de diferentes plásmidos para la síntesis de carotenoides (ver apartado 3.2.1.). Tras introducir el plásmido pTRC003 en estas células, el análisis de los carotenoides presentes en cada transformante no reveló la presencia de ninguno que no fuera el correspondiente al fondo genético de las células JM101 antes de ser transformadas con pTRC0033.

3.13.3. Inactivación de sll0033 en *Synechocystis*

En el estudio de la fase de lectura abierta sll0033 también se llevó a cabo la inactivación de la misma en *Synechocystis* sp. PCC 6803. El gen *npt* de Tn5 se obtuvo como fragmento de restricción *Hinc* II de 1,3 kb a partir de pLR161 y se clonó en el punto *Cla* I de la ORF sll0033 (figura 34A). Se obtuvieron los plásmidos pTRC3300 y pTRC3301. En pTRC3300 el gen *npt* se encuentra en la misma orientación que la ORF

sll0033 y en pTRC3301 se encuentra en la orientación opuesta. La estirpe silvestre de *Synechocystis* se transformó con pTRC3301 y se seleccionaron transformantes en medio BG11 suplementado con kanamicina (apartado 2.5.2.1.).

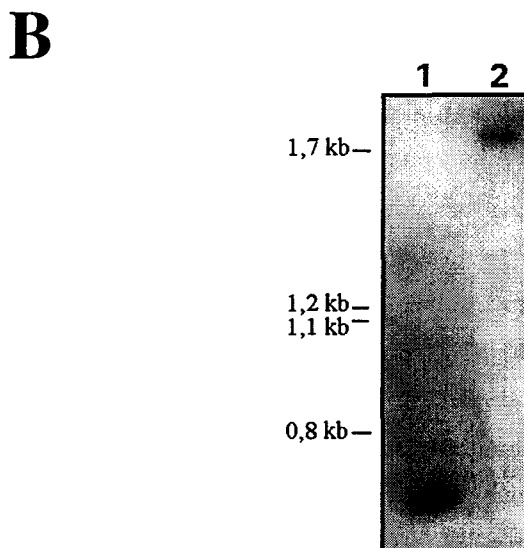
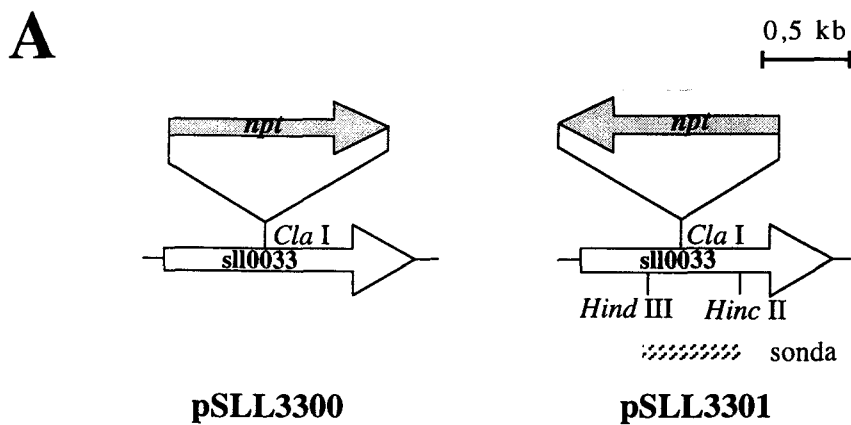


Figura 34. Inactivación de la ORF sll0033 de *Synechocystis*.

A) Estrategia de interrupción de la ORF sll0033 por inserción del gen *npt*. En el plásmido pSLL3300 el gen *npt* se encuentra en la misma orientación que la ORF sll0033 y en pSLL3301 se encuentra en la orientación contraria.

B) Hibridación del DNA genómico de la estirpe silvestre de *Synechocystis* (carril 1) y de la mutante (carril 2) con una sonda interna de sll0033. El DNA se sometió a restricción doble *H*indIII/*H*incII. El fragmento usado como sonda se indica en A). A la izquierda se indica el tamaño de los marcadores.

Los transformantes se sometieron a varias rondas de segregación en medio con antibiótico. No se apreció ninguna diferencia en cuanto a aspecto y crecimiento entre las colonias de la estirpe mutante y las de la estirpe silvestre.

El DNA de un transformante y de la estirpe silvestre se sometió a restricción doble con las enzimas *Hind* III y *Hinc* II. Estas restricciones se analizaron en un gel de agarosa al 0,6% y los fragmentos de DNA se transfirieron a una membrana de nylon (apartados 2.5.5.3. y 2.5.8.1.). La membrana se utilizó en hibridación (aprtado 2.5.8.5.) usando como sonda un fragmento de DNA de sll0033 cortado con *Hind* III y *Hinc* II de 556 pb, que incluye el punto de clonación *Cla* I. En el carril del transformante aparecía una sólo banda de hibridación de 1,85 kb frente a la banda del silvestre de aproximadamente 550 pb (figura 34B). Este resultado nos indicó que la mutación había sido segregada completamente.

En el análisis de carotenoides de la estirpe silvestre y de la mutante no se apreciaron diferencias. Por tanto, los resultados mostrados para *Synechocystis* concuerdan con los obtenidos en *E. coli* y apuntan a que sll0033 no codifica ninguna enzima de la ruta carotenogénica mayoritaria en esta cianobacteria.

3.14. ESTUDIO DE LA FASE DE LECTURA ABIERTA slr0940

3.14.1. Análisis de la secuencia de slr0940

Como se ha mencionado anteriormente el producto del gen slr0940 de *Synechocystis* tiene una homología significativa con las ζ -caroteno desaturasas de tipo planta (65% de identidad con *zds-1* de *Arabidopsis*). La comparación de secuencias de las diferentes ζ -caroteno desaturasas muestra que la enzima de tipo planta (*zds-1*) y slr0940 de *Synechocystis* son muy similares, mientras que la única región conservada con *crtQ-1* de *Anabaena* es el motivo de unión al nucleótido en el extremo amino (figura 35).

```

=====
Arabidopsis zds-1  --LKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYDSRTFIGA-KVGSFVDRRGNHIEMGLHVF 57
Capsicum zds-1   --LKVAIIGAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRTFIGG-KVGSFVDRKRNHIEMGLHVF 57
Synechocystis slr0940 --MRVAIVGAGLAGMATAVELVDAGHEVELYEARSFIGG-KVGSWVDGDGNHIEMGLHVF 57
Anabaena crtQ-1  MSKKVAIVGAGPGGLATAIRLAGLGYQVEIFEAAERVGGMRGFEVDSYAFDTGPTILQL 60
          .***.*** *..** * * *..... * * **

```

<i>Arabidopsis zds-1</i>	FGCYNNLFRMLMKVGAEKNLVVDKHTHTFFIN-KDGTIGEL--DFR-PPVGAPIHGIRAF 113
<i>Capsicum zds-1</i>	FGCYNNLFRMLMKVGAEKNLVVDKHTHTFFVN-KGGEIGEL--DFR-PPVGAPLHGIRAF 113
<i>Synechocystis slr0940</i>	FGCYNNLFRMLMEKVGAKQNLRLKEHTHTFFVN-QGGRIGEL--DFR-FLTGAPFNGLKAFF 113
<i>Anabaena crtQ-1</i>	PHLYKELFEEAGLNFADYVQLKRLPEYTRLKFWDGTQLDITSDLQSFST--QLATLRS 118
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	VTSQLKPYDKLRNSLALALSPVVKALVDPD-GAMRDIRNLDISFSDWFLSKGGTRASIQ 172
<i>Capsicum zds-1</i>	STNQLKTYDKARNAVALALSFPVVRALVDPD-GALQQIRDLDSVSFSDWFMSKGGTRASIQ 172
<i>Synechocystis slr0940</i>	TTSQLDITKDKIANSIALATSPVIRGLVDFD-GAMKTRIRDLDRISFAEWFSLKGGNEGSLK 172
<i>Anabaena crtQ-1</i>	PLAFDRWYSEHIRKYELGYKPYLAGPARSIFGYLRPDDLKFLSFRPW--ENLYQHFWR 175
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	RMWDP-VAYALGF-IDCDNMSARCLMIFSLFATKTEASLLRMLKGSPPVYLSGPIKQYI 230
<i>Capsicum zds-1</i>	RMWDP-VAYALGF-IDCDNISARCLMIFALFATKTEASLLRMLKGSPPVYLSGPIKQYI 230
<i>Synechocystis slr0940</i>	KMWDP-IAYALGF-IDTENISARCLMIFQLFAARTEASVLRMLEGSPQEYHLKPIQEYL 230
<i>Anabaena crtQ-1</i>	FFQDERLVIYDLRYPKYLGMHPTVASSVFSLIPLFEFSQGVHFPVGGFRALAQG-LANAA 234
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	TDRGRIHLRWGCREIILYDKSADGETYVTGLAISKAT---NKKIVKAD-VYVAACDVP 285
<i>Capsicum zds-1</i>	IDKGRFHLRWGCREVLYETSDDGSMYVSGLAMSKAT---QKKIVKAD-AVVAACVVP 285
<i>Synechocystis slr0940</i>	EQRGTKFYTRHKVKEI-KTKVTDGETRVTGLIINDGV---ETKVTAD-AVVAACDVP 284
<i>Anabaena crtQ-1</i>	QDLGVKIHLSFPVHQIWIWQ---G--QVRGLELADASRHQFDITVINADFAVYRHLLEPT 289
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	IKR-LLPKWR-ESRFFNDIYELGVVVTGQLRY-NGWVTELDQIELARQLKRAVGLDN 342
<i>Capsicum zds-1</i>	IKR-LVPQWR-ELEFPNIYKLVGVVVTGQLRY-NGWVTELDQLERSRQSKRATGLDN 342
<i>Synechocystis slr0940</i>	IKN-LLPENWRTQWDFNKIYYLDTVPVATVQLRF-DGWVTEMDPAKRKQLEQAFGLDN 342
<i>Anabaena crtQ-1</i>	SARGRYTGNKLGQMQFSCSTFML----YLGINRRYEDLPHQIYLSDNIRRLERPVWDDS 345
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	LLYTPDADF-SCFADLALASPADYIEGQGLTQCVLTPGDPYMRMPNDKIEKVAMQVT 401
<i>Capsicum zds-1</i>	LLYTPDADF-SCFADLALASPEDYIEGQGLTQCVLTPGDPYMLPNEEIRRVSKQVL 401
<i>Synechocystis slr0940</i>	LLYTSDAEF-SCFADLALASPADYIRPGEGLLQVLTPGDPFMKESNEAIAYRVLQVK 401
<i>Anabaena crtQ-1</i>	ALDETDPFVVCNP--TIIDPSNAP-AGHSTLF--VLVP----IPNTSYAVDWDIKQKSY 396
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	ELFPSPRGLVETCSSVVK---IAQSLYREAPGKDPFR---PDQKTPIKNFFLAGSYTKQD 455
<i>Capsicum zds-1</i>	ALFPSSQGLEVTWSSVVK---IGQSLYREGPGKDPFR---PDQKTPVENFFLAGSYTKQD 455
<i>Synechocystis slr0940</i>	ALFPSAADLNMTWYSVIK---LAQSLYREAPGMDLFR---PSQATPIANFFLAGSYTKQD 455
<i>Anabaena crtQ-1</i>	TDFILKR-LHLLGYHNIEQHIVTQSCYTAQSWLDDYRVHLGAVFNLSHNLTLQGFRRPPI 455
	* * * * *
<i>Arabidopsis zds-1</i>	YIDSMEGATLSGRQASSYICDAGEELAE LNKKLS-----SSATAVPDEL SLV-- 502
<i>Capsicum zds-1</i>	YIDSMEGATLSGRQASAYICDAGEQLLALRKKIAAAELNEISKGVSLDEL SLV-- 509
<i>Synechocystis slr0940</i>	YIDSMEGATLSGR-----QAAQAILANQARLQ-----TAVLASQ----- 489
<i>Anabaena crtQ-1</i>	RSENIAGLYWIGG-----AVHPGSLLTILEASR-----SAAGFIHQDFASTGS 499
	* * * * *

Figura 35. Comparación entre distintas ζ -caroteno desaturasas conocidas y slr0940.

Los asteriscos indican residuos idénticos y los puntos indican residuos similares. El sitio de unión a nucleótidos se indica por una doble línea sobre la figura. Para las proteínas de plantas se ha omitido la secuencia correspondiente al péptido de tránsito.

3.14.2. Expresión de la ORF slr0940 en *E. coli*

Con objeto de determinar si el producto de expresión de la ORF slr0940 de *Synechocystis* era una ζ -caroteno desaturasa, en primer lugar se realizaron experimentos de complementación funcional en *E. coli*. Para ello células de JM101 portadoras de los plásmidos pACCRT-EBP o pACCRT-EBI_{Rc} con los genes necesarios para la síntesis de ζ -caroteno o neurosporeno respectivamente (tabla 2) fueron transformadas con el plásmido pTRC0940. Los transformantes correspondientes se

cultivaron y recogieron según se detalla en el apartado 2.1.2.2. y los carotenoides presentes fueron analizados (apartado 2.6.3.). El contenido en carotenoides de los transformantes se presenta en la tabla 7.

TABLA 7. Carotenoides que forma *E. coli* después de la complementación de pTRC0940 con otros plásmidos carotenogénicos.

	<u>Concentración de carotenoides (mg/g peso seco)</u>		
	<u>ζ-caroteno</u>	<u>neurosporeno</u>	<u>licopeno</u>
pACCRT-EBP	211	n.d.	n.d.
pACCRT-EBP + pTRC0940	114	32	97
pACCRT-EBI _{Rc}	n.d.	282	15
pACCRT-EBI _{Rc} + pTRC0940	n.d.	195	67

n.d.= no detectable

Los carotenoides que no fueron convertidos por el producto del gen *slr0940* son fitoeno, diapofitoeno y licopeno.

Cuando se expresaron conjuntamente los plásmidos pACCRT-EBP y pTRC0940 más de la mitad del ζ-caroteno fue convertido en neurosporeno y licopeno con uno o dos enlaces dobles adicionales respectivamente. La cotransformación de pTRC0940 con pACCRT-EBI_{Rc} condujo a un incremento de más de 4 veces en el contenido de licopeno respecto del que se aprecia en ausencia de pTRC0940 y a un descenso en el contenido de neurosporeno. Estos resultados indican que el gen *slr0940* codifica una enzima capaz de catalizar la conversión de ζ-caroteno en licopeno via neurosporeno, es decir, que codifica la ζ-caroteno desaturasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803. La complementación posterior con células de JM101 capaces de sintetizar otros carotenoides puso de manifiesto que la enzima codificada por *slr0940* no puede utilizar como sustrato fitoeno, diapofitoeno ni licopeno.

Al nuevo gen se le denominó *crtQ-2* de acuerdo con la nomenclatura de los genes procarióticos involucrados en carotenogénesis y para diferenciarlo del gen *crtQ-1* de

Anabaena que codifica una ζ -caroteno desaturasa estructuralmente diferente de la de *Synechocystis*.

3.15. CARACTERIZACION *IN VITRO* DE LA ζ -CAROTENO DESATURASA DE *Synechocystis*

Para confirmar los resultados que se habían obtenido por complementación se realizaron estudios cinéticos de la proteína expresada por pTRC0940. Para ello se

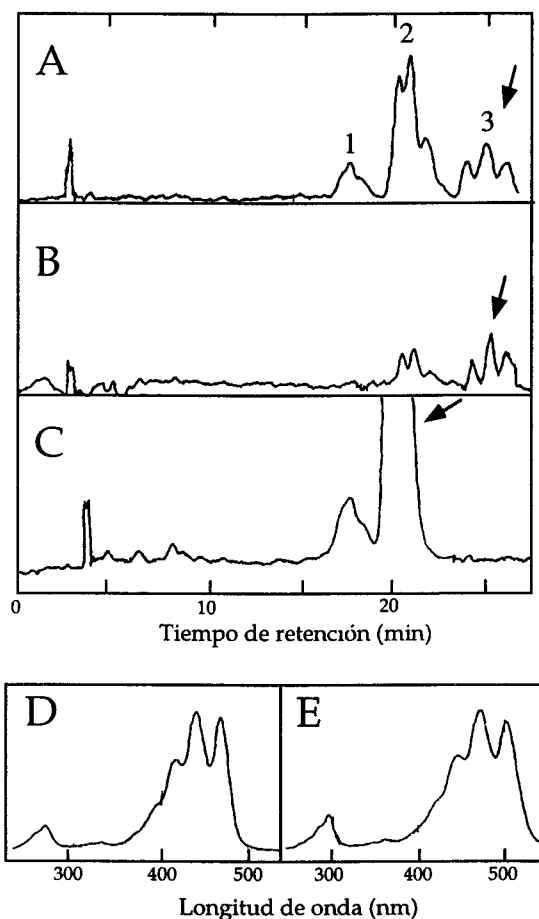


Figura 36. Conversión *in vitro* de ζ -caroteno y neurosporeno por el producto de expresión del gen *slr0940*.

Perfiles de HPLC del ensayo añadiendo ζ -caroteno (A), ζ -caroteno más 50 mM de J852 (B) o neurosporeno (C). Los picos que se identificaron fueron licopeno (1), neurosporeno (2) y ζ -caroteno (3). Los diferentes subpicos de cada pico corresponden a distintos estereoisómeros de los carotenoides indicados. Los picos que representan los sustratos añadidos en cada reacción se indican por una flecha. El espectro de los picos 2 y 3 se muestra en D y E respectivamente.

prepararon extractos libres de células de *E. coli* portadoras del plásmido pTRC0940 (apartado 2.2.2.) y se ensayaron con ζ -caroteno o neurosporeno como sustrato y con NAD y NADP como cofactores (apartado 2.4.3.). En uno de los ensayos se utilizó el herbicida J852 que inhibe la ζ -caroteno desaturasa de tipo planta (Sandmann *et al.*, 1985; Sandmann y Böger, 1989). Los productos de la reacción se analizaron por HPLC (apartado 2.6.3., figura 36 A-C). Como se observa en la figura 36A cuando se usó ζ -caroteno como sustrato los carotenoides acumulados fueron neurosporeno (pico 2) así como licopeno (pico 1). Cuando se realizaba el mismo ensayo en presencia de J852 50 μ M (figura 36B) la síntesis de los productos se veía fuertemente reprimida y sólo se apreciaba una pequeña cantidad (25% del control) del pigmento intermediario neurosporeno. Si el sustrato utilizado era neurosporeno éste era convertido en licopeno (figura 36C) aunque la eficiencia de la conversión era menor que con ζ -caroteno como sustrato de la reacción.

4. DISCUSSION

4.1. MUTACION DE RESISTENCIA A NICOTINA Y MPTA AISLADA EN *Synechocystis* sp. PCC 6803. ORF sll0147

Se ha aislado una mutación en el genomio de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 que provoca resistencia cruzada a nicotina y MPTA, dos inhibidores específicos de la enzima carotenogénica ciclasa del licopeno (Sandmann y Böger, 1989). La mutación se localiza en una ORF denominada sll0147 (ORF B) cuya única homología con los genes de ciclasas de licopeno aislados (*crtL* y *crtY*) radica en el sitio de unión al nucleótido.

Se ha estimado la inhibición *in vivo* (I_{50}) de la síntesis de carotenoides en la estirpe silvestre y en la portadora de la mutación (MPTA1) frente a nicotina y MPTA, determinándose que el mutante presenta una menor inhibición que el silvestre en ambos casos. La resistencia presentada por MPTA1 a nicotina es unas 5 veces superior a la exhibida para MPTA. Los factores de resistencia que se observan en MPTA1 podrían deberse a una mutación en la enzima ciclasa del licopeno que afecte a su interacción con los herbicidas, a una sobreexpresión de la proteína, a un proceso de detoxificación o a una exclusión de los herbicidas de la célula. Aún no se ha desarrollado un ensayo *in vitro* fiable para la ciclasa de licopeno partiendo de extractos celulares por lo que no es posible calcular las K_i de las estirpes mutante y silvestre, lo cual sin duda contribuiría a aclarar la causa de la resistencia de la estirpe MPTA1. En el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942 hay una mutación de resistencia a MPTA caracterizada que afecta al gen *crtL* correspondiente a la licopeno ciclasa de esta cianobacteria (Cunningham *et al.*, 1993). En *Capsicum annuum* se han identificado recientemente los residuos aminoacídicos a los que se une la nicotina en dos ciclasas de carotenoides: ciclasa del licopeno y sintasa de capsantina-capsorubina (Bouvier *et al.*, 1997). Estos residuos se localizan en dos dominios y también aparecen, con pocos cambios, en la ciclasa del licopeno de *Synechococcus* pero no así en la proteína codificada por sll0147 lo que parece indicar que esta proteína no tiene capacidad de unión a nicotina. Según este razonamiento la resistencia de la estirpe MPTA1 se podría deber a cualquiera de las otras causas mencionadas anteriormente.

Por otra parte, la ausencia de complementación observada cuando células JM101 productoras de distintos carotenoides son transformadas con los plásmidos pBF1000 y

pBF3000 (apartado 3.5.2.1.) parecen apuntar a que la enzima codificada por sll0147 (ORF B) no es ninguna de la ruta de carotenogénesis aunque podría simplemente ser que esta proteína no sea funcional en *E. coli* o bien que los niveles de expresión alcanzados no sean suficientes para complementar adecuadamente.

En cianobacterias, la enzima ciclasa del licopeno es esencial y la ORF sll0147 de *Synechocystis* es también esencial, como se deduce de la mortalidad provocada por su delección en la estirpe silvestre. Así mismo, a pesar de que *Synechocystis* debe tener un enzima para ciclar el licopeno, pues sintetiza β -caroteno a partir del mismo, en su genomio no existe ninguna ORF que presente homología con los genes *crtL* ni *crtY* que codifican respectivamente ciclasas de licopeno de tipo planta o de tipo bacteriano. Esto indica que la licopeno ciclasa de *Synechocystis* es estructuralmente distinta a las descritas hasta ahora.

Así pues, con las herramientas de trabajo de que disponemos no hemos podido determinar la función de la ORF sll0147 de *Synechocystis*. Se tienen datos tanto a favor como en contra acerca de la posibilidad de que esta fase de lectura abierta codifique la ciclasa del licopeno. Entre los datos a favor se encontrarían que una mutación dentro de la ORF sll0147 provoca resistencia cruzada a dos inhibidores de la enzima citada, que la enzima codificada por sll0147 es esencial y que en *Synechocystis* no se identifica una ORF con homología clara con los genes de ciclasas de carotenoides aislados hasta ahora. En contra se tendrían la ausencia de complementación con una estirpe productora de licopeno de *E. coli* y la carencia del sitio de unión a nicotina de las otras ciclasas de carotenoides.

En cualquier caso, el enigma sobre la función de sll0147 permanece y será necesario el desarrollo de trabajos posteriores encaminados a resolverlo.

4.2. EFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ SOBRE LA EXPRESION DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES *crtP* Y *crtB* DE *Synechocystis*

La síntesis de carotenos se ve estimulada por altas intensidades de luz en numerosos organismos. A nivel molecular, se ha comprobado que en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 los niveles de mRNA de una proteína que se une a carotenos

aumentan o son inducidos por alta intensidad de iluminación (Reddy *et al.*, 1989). Los estudios moleculares de genes implicados en la síntesis de carotenoides se han limitado a plantas. Así, se ha determinado que los transcritos del gen *crtP* de tomate aumentan en condiciones de alta irradiancia (Pecker *et al.*, 1992b) mientras que en el caso de *Arabidopsis thaliana* y *Sinapis alba* se ha observado acumulación dependiente de luz de los mRNA del gen *crtB*, sin que se vean afectados los transcritos del gen *crtP* (von Lintin *et al.*, 1997). Por otra parte, en *Synechococcus* se ha establecido una relación directa entre el contenido de carotenos y la actividad fotosintética de manera que el contenido de carotenos es limitante para la fotosíntesis (Sandmann *et al.*, 1993). Finalmente en *Synechococcus* y en *Synechocystis* parece que la desaturación de fitoeno es el paso limitante en la síntesis de carotenoides (Chamovitz *et al.*, 1993).

En este trabajo se ha demostrado que los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* se transcriben a partir de distintos promotores localizándose el inicio de la transcripción de los mismos. También se ha determinado que la transcripción de ambos genes está afectada por la intensidad de luz.

Las secuencias promotoras y responsables de la respuesta a la intensidad de luz del gen *crtP* se habían localizado previamente (Martínez Férrez, 1994) y se encuentran entre las posiciones -78 y -6. Se había estudiado la activación por la intensidad de luz del gen *crtP* clonando las secuencias promotoras delante de un gen *cat* sin promotor e introduciéndolas sobre plásmidos en *Synechocystis*. De esta forma se había observado una activación de la expresión *cat* cuando las células portadoras de tales construcciones se sometían a 22 h de crecimiento en alta intensidad de luz ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En este trabajo se ha continuado el estudio de la regulación por luz del promotor del gen *crtP*. Para ello se han clonado las construcciones mencionadas (región promotora de *crtP* fusionada a gen *cat* sin promotor) en una región dispensable del cromosoma de *Synechocystis* y se ha determinado la actividad CAT en extractos de las estirpes portadoras de las construcciones cuando se someten a distintas condiciones de iluminación a lo largo del tiempo. De esta forma se ha determinado que el aumento en la intensidad de iluminación induce activación en la actividad CAT de la estirpe FG502 portadora de la fusión del gen *cat* (figura 19). El incremento de actividad se detecta a los 15 minutos de cambiar el cultivo desde $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el caso del gen *psbAIII* de *Synechococcus* se ha observado una respuesta de activación similar (Kulkarni *et al.*, 1992). Por su parte, los análisis de mRNA de *crtP* (figura 17) también

muestran una inducción de la transcripción del gen detectable en los primeros 5 min de iluminación.

En el caso del gen *crtB* se han realizado también fusiones transcripcionales de la región 5' del gen con un gen *cat* sin promotor y se han introducido en el cromosoma de *Synechocystis*. Mediante la determinación de la actividad CAT de las estirpes portadoras de tales fusiones, se han localizado las secuencias promotoras del gen y se ha determinado la influencia de la intensidad de luz sobre la actividad del promotor. Así se ha determinado que la secuencia situada entre los puntos -192 y -71 es necesaria para la expresión del gen. En la estirpe FG603 portadora de una fusión de -192 a +73 clonada delante del gen *cat* la se observa una respuesta de inducción de la actividad CAT similar a la detectada en el caso de la estirpe FG502 que lleva el promotor del gen *crtP*. Así pues, a diferencia de lo que ocurre en plantas en las que la expresión de sólo uno de estos dos genes se ve afectada por la luz (*crtP* en tomate y *crtB* en *Arabidopsis* y *Sinapis*), parece que en *Synechocystis* la luz influye sobre la expresión de ambos genes y además, hay una coordinación en la regulación de la expresión.

Por otra parte, el análisis de secuencias situadas en las proximidades del inicio de la transcripción de *crtP* y *crtB* ha mostrado una homología bastante alta entre las mismas (apartado 3.8.2.4.) lo que concordaría con la similitud de respuesta frente a alta luz que muestran estos dos genes.

4.3. IDENTIFICACION DE LA ORF slr0088 DE *Synechocystis* sp. PCC6803 COMO LA CETOLASA DE β -CAROTENO

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *Synechocystis* nos ha dado la posibilidad de buscar genes implicados en la ruta de carotenogénesis no caracterizados todavía. Entre las fases de lectura abierta presentes en el genoma de *Synechocystis* hay una denominada slr0088 que presenta homología significativa con los genes de desaturasas de fitoeno de tipo bacteriano al igual que ocurre con la ζ -caroteno desaturasa de *Anabaena*. En este trabajo se ha aislado y caracterizado la ORF slr0088 de *Synechocystis* demostrándose que se trata de una cetolasa de β -caroteno.

Se ha construido una estirpe mutante de *Synechocystis* carente del gen *crtO* (slr0088) funcional. Esta estirpe no acumula equinonona y tiene niveles normales de β -

caroteno en condiciones normales de crecimiento ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Así pues, *crtO* no se requiere para los pasos de desaturación necesarios en la producción de β -caroteno excluyendo la posibilidad de que se trate del gen de una ζ -caroteno desaturasa funcional de *Synechocystis*.

Cabe destacar que *crtO* está muy cercano a otros genes y situado en la misma orientación en lo que posiblemente sea un operón. Entonces, la inactivación de *crtO* podría afectar a la expresión de estos otros genes provocando el fenotipo que se observa en el mutante *crtO*⁻. Sin embargo la función de tales genes no esta hipotéticamente relacionada con la biosíntesis de carotenoides, como se deduce de la homología de secuencias, y algunos de ellos parecen ser esenciales. En cualquier caso, un efecto polar sobre estos genes situados "aguas abajo" de *crtO* no explicaría la actividad *in vitro* del producto de *crtO* ni la complementación observada en *E. coli*, que indican que el producto de *crtO* actúa como una cetolasa de β -caroteno sintetizando equinenona a partir del primero.

Cuando *crtO* se expresa en *E. coli*, alrededor del 10% del producto de la reacción es cantaxantina. Parece pues que *crtO* no tiene una especificidad estricta para β -caroteno sino que, con una tasa baja, puede introducir un grupo ceto en el segundo anillo β de la equinenona para generar cantaxantina. Sin embargo, este efecto se explicaría debido a los altos niveles de expresión de la cetolasa en *E. coli* y está restringido al sistema heterólogo de esta bacteria, ya que *Synechocystis* no acumula cantaxantina.

A pesar de tratarse de una cetolasa de β -caroteno, CrtO es homóloga a desaturasas de fitoeno de tipo CrtI como se ejemplifica por la enzima de *Erwinia herbicola* (figura 29). El mecanismo de las cetolasas de carotenoides no se conoce en detalle pero la enzima codificada por el gen *crtW*, que actúa simétricamente sobre la molécula de β -caroteno, es probablemente una dioxigenasa (Fraser *et al.*, 1997). En el caso de la cetolasa derivada de *crtO* se observa una dependencia de NADPH de la reacción. Este resultado podría estar indicando la presencia de un mecanismo de reacción diferente responsable de la introducción del grupo ceto que involucraría una hidroxilación de tipo monooxigenasa seguida de una deshidrogenación. CrtO contiene un sitio de unión a nucleótidos en el extremo amino similar al encontrado en las fitoeno desaturasas y tal sitio sería probablemente el de unión al cofactor NADPH.

Las β -caroteno cetolasas que actúan simétricamente (tipo CrtW) son homólogas entre sí y no se parecen a la β -caroteno cetolasa caracterizada en este trabajo (figura 29). El gen *crtO* codifica una enzima completamente distinta que se relaciona filogenéticamente con desaturasas más que con β -caroteno cetolasas. Además, CrtO tiene un mecanismo de reconocimiento del sustrato completamente distinto ya que actúa asimétricamente sobre la molécula de β -caroteno introduciendo sólo un grupo ceto en uno de los anillos, mientras que las cetolasas de tipo CrtW introducen un grupo ceto en cada uno de los anillos del β -caroteno generando cantaxantina.

Las cetolasas de carotenos y sus genes tienen un alto valor biotecnológico para la producción de carotenoides de interés comercial (Nelis y de Leenheer, 1991). La nueva cetolasa descrita en este trabajo proporciona una mayor flexibilidad en el diseño de procedimientos biotecnológicos para la producción de carotenoides de interés aplicado. La cetolasa de β -caroteno de *Synechocystis* podría ser útil en la producción de equinenona y de otros carotenoides asimétricos como 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona y adonixantina si se expresa en combinación con un gen de hidroxilasa de carotenoides (*crtZ*).

4.4. FUNCION DE LA EQUINENONA EN *Synechocystis*

En este trabajo se ha construido un mutante de *Synechocystis* deficiente en la biosíntesis de equinenona que facilitará el estudio de la función de este carotenoide.

Se ha sugerido que la equinenona podría estar situada cerca de los centros de reacción en las membranas tilacoidales en otra cianobacteria relacionada (Nonnengießer *et al.*, 1996). Nuestros resultados indican que la ausencia de equinenona no tiene efecto sobre la tasa de crecimiento ni sobre el desprendimiento de oxígeno en condiciones de baja o alta intensidad de luz (apartado 3.12.1.), por lo que la equinenona no parece estar asociada a los centros de reacción en *Synechocystis*.

También en cianobacterias se ha propuesto un papel protector frente a la luz ultravioleta para la equinenona (Buckley y Houfhton, 1976; Paerl, 1984; Ehling-Schulz *et al.*, 1977). Nuestros resultados indican que este no parece ser el caso de *Synechocystis* puesto que la tasa de supervivencia de las estirpes silvestre y *crtO*⁻ irradiadas con luz U.V. en distintas condiciones (apartado 3.12.2.), es la misma en ambos casos. Por tanto,

el papel de la equinenona en *Synechocystis* requiere que se lleven a cabo investigaciones posteriores.

4.5. IDENTIFICACION DE LA ORF sll0940 COMO LA ζ -CAROTENO DESATURASA DE *Synechocystis*.

Debido a su similitud con los tipos de ζ -caroteno desaturasas caracterizados, los genes slr0940 y sll0033 del genomio de *Synechocystis* eran candidatos a codificar tal enzima en esta cianobacteria. Así, slr0940 presenta homología con la ζ -caroteno desaturasa de plantas, mientras que sll0033 se parece a las desaturasas de carotenoides de tipo CrtI o cianobacterianas de la misma manera que el gen *crtQ* de *Anabaena*. (apartado 3.9.) Hemos clonado ambas ORFs y demostrado que slr0940 corresponde realmente al gen de la desaturasa de ζ -caroteno de *Synechocystis*.

En el caso de sll0033, el producto de expresión no cataliza la desaturación de ζ -caroteno ni parece estar involucrado en ninguna de las reacciones de la ruta de carotenogénesis que se muestra en la figura 1 (apartado 3.13.). Sin embargo, en el caso de slr0940 hemos identificado el gen de la ζ -caroteno desaturasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Así, el enzima codificado por slr0940 lleva a cabo las reacciones de desaturación necesarias para convertir el ζ -caroteno o el neurosporeno en licopeno. Este resultado ha sido demostrado por complementación *in vivo* en *E. coli* (tabla 7) así como por los ensayos enzimáticos desarrollados *in vitro* (figura 36). Además, la ζ -caroteno desaturasa de tipo planta es inhibida por derivados pirimidínicos (Sandmann *et al.*, 1985; Sandmann y Böger, 1989) y esto también se observa en la reacción enzimática catalizada por slr0940, como indica el efecto del inhibidor J852 en los ensayos realizados *in vitro* (figura 36). En contraste, la enzima de *Anabaena* no es inhibida por este compuesto (Albrecht *et al.*, 1996) por lo que al tratarse de otro tipo de ζ -caroteno desaturasa, al gen de *Anabaena* se le ha denominado *crtQ-1* y al correspondiente de *Synechocystis*, *crtQ-2*.

4.6. ANALISIS FILOGENETICO DE LOS GENES Y ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES EN CIANOBACTERIAS

Los carotenoides son esenciales para los organismos fotosintéticos como pigmentos accesorios y como protectores frente el exceso de luz. A diferencia de lo que

ocurre con las bacterias de fotosíntesis anoxigénica, las cianobacterias poseen carotenoides con grupos cíclicos terminales. La presencia de β -caroteno es universal en todas las cianobacterias aunque la capacidad de sintetizar derivados oxigenados difiere entre los distintos géneros. Los compuestos oxigenados más abundantes son la zeaxantina con dos grupos hidroxilo y los carotenoides con grupos ceto equinenona y cantaxantina (figura 1). Los carotenoides minoritarios son el derivado glicosilado del γ -caroteno mixoxantofila y los derivados hidroxilados de la zeaxantina, caloxantina y nostoxantina.

Todos los carotenoides cianobacterianos se sintetizan a través de una ruta (figura 1) en la que los intermediarios son los mismos que para otras bacterias, hongos, algas o plantas superiores. Sin embargo, muchos de las enzimas cianobacterianas involucradas en la catálisis de pasos individuales difieren en mecanismo o derivan de genes no homólogos. Entre las cianobacterias existen varios genes que han sido adquiridos nuevamente o modificados funcionalmente. De todos los genes de la ruta biosintética de carotenoides los únicos que se han conservado entre los distintos organismos son los correspondientes a la síntesis de fitoeno. En los cuatro pasos de desaturación posteriores desde 15-*cis* fitoeno hasta licopeno la situación de las cianobacterias es distinta a la del resto de procariontes. Mientras que en otras bacterias y en hongos la secuencia de desaturación completa es llevada a cabo por una desaturasa de tipo bacteriano (genes *crtI*), en cianobacterias y plantas existen dos enzimas distintas que realizan dos pasos de desaturación secuenciales cada una: la desaturasa de fitoeno (genes *crtP*) y la desaturasa de ζ -caroteno (genes *crtQ*). En plantas estos dos genes son homólogos entre sí y no se parecen a los genes *crtI*. En cianobacterias la situación es más compleja. Así, mientras que la fitoeno desaturasa es homóloga a las desaturasas de tipo planta, existen dos tipos de ζ -caroteno desaturasa que son estructuralmente diferentes. Una de ellas, *CrtQ-1* de *Anabaena*, se parece a las desaturasas de tipo bacteriano (*CrtI*) y la otra, *CrtQ-2* de *Synechocystis* a las desaturasas de plantas (*CrtP*). Esto queda reflejado en el análisis comparativo de las distintas proteínas de la figura 37 en la que se analizan las desaturasas de fitoeno y de ζ -caroteno de cianobacterias frente a la desaturasa de fitoeno de *Erwinia uredovora* (tipo bacteria) o a una desaturasa de fitoeno de tipo planta.

El análisis filogenético de las desaturasas de carotenoides caracterizadas (figura 38) sugiere que las desaturasas de ζ -caroteno de *Synechocystis* y la de plantas

debieron divergir después de la separación de la rama que dio lugar a las desaturasas de fitoeno de tipo planta y cianobacteriano. Así pues, la hipotética duplicación génica que dio lugar a las desaturasas de fitoeno de tipo planta por un lado y a las ζ -caroteno desaturasas también de tipo planta por el otro, debió suceder en un antepasado de la cianobacterias del que derivarían los cloroplastos de plantas superiores.

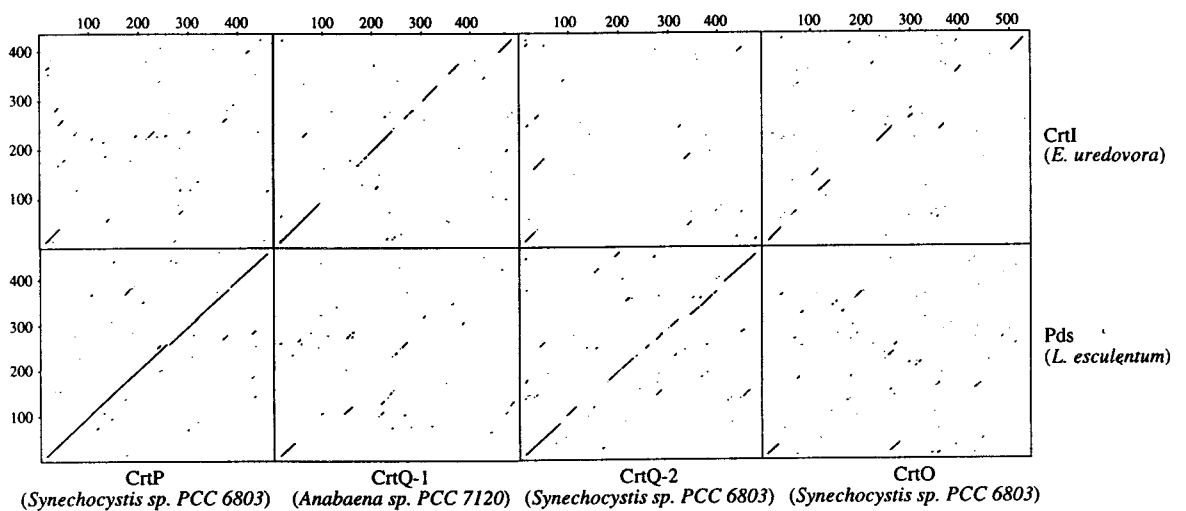


Figura 37. Comparación entre las desaturasas de carotenoides cianobacterianas (CrtP, CrtQ-1, CrtQ-2 y CrtO) con la desaturasa de fitoeno de tipo bacteria de *Erwinia uredovora* (CrtI) y una de tipo planta de *Lycopersicon esculentum* (Pds). La similaridad se calculó con una ventana de 21 aminoácidos y una identidad de 12 usando el programa Compare del paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984).

En este contexto es sorprendente que la ζ -caroteno desaturasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 sea similar a las desaturasas de tipo bacteriano o CrtI. Como ya se ha mencionado, las desaturasas de tipo CrtI no están relacionadas con las enzimas de tipo planta y pueden catalizar los cuatro pasos de desaturación de fitoeno a licopeno. En *Anabaena* se ha sugerido que una enzima de tipo planta asumió la función de los dos primeros pasos de desaturación desde fitoeno a ζ -caroteno (CrtP) y que la ancestral enzima de tipo CrtI ha quedado restringida a las dos últimas desaturaciones desde ζ -caroteno hasta licopeno (Linden *et al.*, 1994). Siguiendo este razonamiento podemos

concluir que en *Synechocystis* así como en el antecesor de los cloroplastos la enzima de tipo planta adquirió también la función de desaturar el ζ -caroteno. En cualquier caso, aún queda por aclarar cuál es la situación general en cianobacterias ya que se han

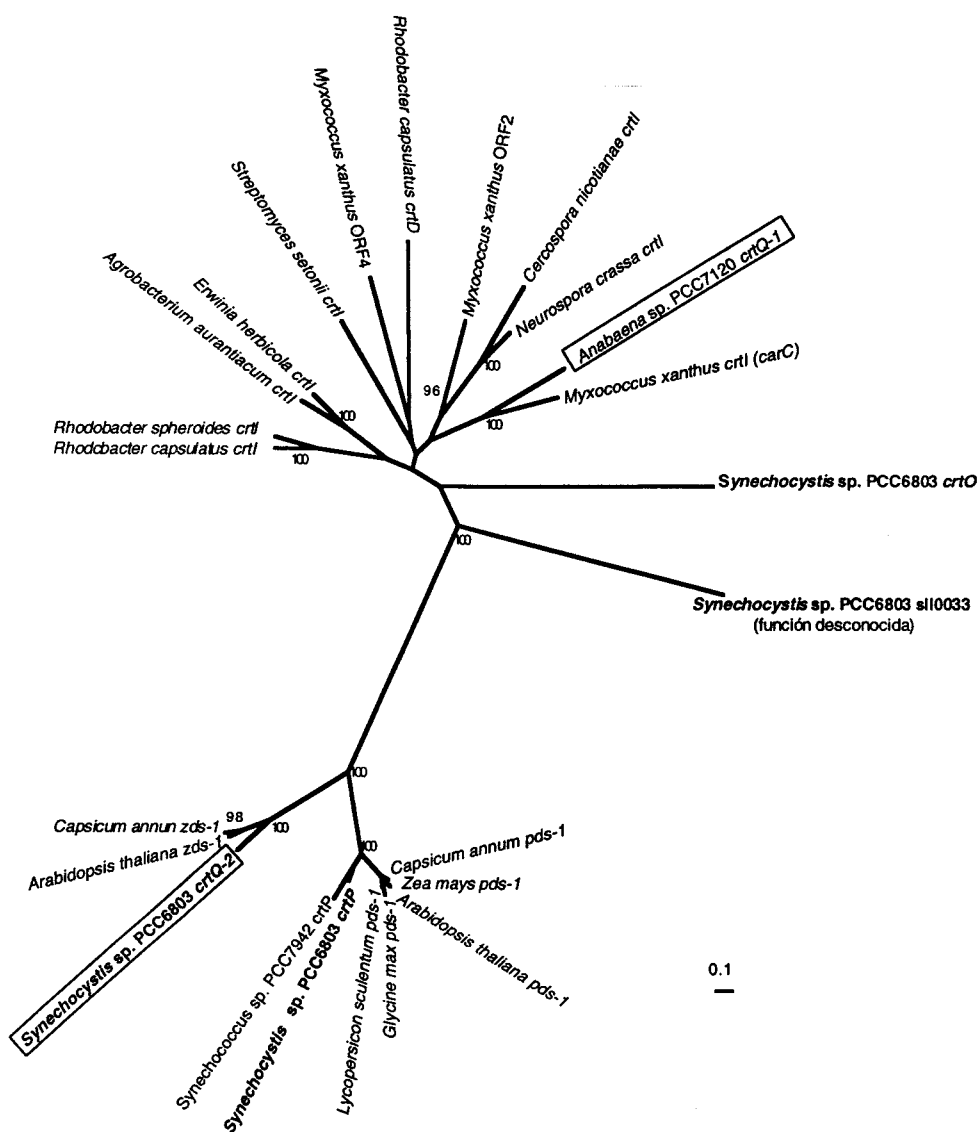


Figura 38. Arbol filogenético de las desaturasas de carotenoides y proteínas relacionadas.

Las secuencias de *Synechocystis* se muestran en negrita. Los dos tipos de ζ -caroteno desaturasas cianobacterianas están recuadrados. Los valores de remuestreo superiores al 80% aparecen indicados.

caracterizado las ζ -caroteno desaturasas de sólo dos especies cianobacterianas y cada una es de un tipo. La falta de hibridación del gen *crtQ-1* de *Anabaena* con el DNA de otras cianobacterias (Albrecht *et al.*, 1995) sugeriría que *crtQ-1* es una peculiaridad de esta especie fijadora de dinitrógeno. De hecho, se ha propuesto que *crtQ-1* puede estar restringido a especies fijadoras de N₂ y localizado en los heterocistos (Albrecht *et al.*, 1995). Todavía queda por resolver si el gen aislado en *Anabaena* es el único que presenta o si posee también una enzima de tipo CrtQ-2 lo que sin duda contribuiría a la comprensión de la evolución de los diferentes genes de desaturasas de ζ -caroteno cianobacterianas.

Independientemente del tipo de enzima, cualquier clase de desaturasa de fitoeno o de ζ -caroteno debe tener la propiedad de reconocer al fitoeno o al ζ -caroteno respectivamente como sustratos. En el reconocimiento del fitoeno por parte de la fitoeno desaturasa podrían ser importantes la región trienoica central del sustrato y la configuración en *cis* del doble enlace central. Las desaturasas de tipo CrtP difieren de las de tipo CrtI en el requerimiento de cofactores, usando NAD(P) las primeras y FAD las segundas, y en la sensibilidad a herbicidas (Sandmann, 1994). La unión específica de ζ -caroteno a la ζ -caroteno desaturasa se podría explicar asumiendo que esta enzima reconoce un sistema conjugado más largo, por ejemplo una estructura heptaénica, adyacente a la posición en la que debe introducir el doble enlace.

La ruta de biosíntesis de carotenoides conlleva la ciclación de licopeno a β -caroteno tras los pasos de desaturación. El único gen disponible de una ciclasa de licopeno cianobacteriana es el de *Synechococcus*. Este gen (*crtL*) se parece poco a otros genes de ciclasas bacterianas (*crtY*) y bastante más a la enzima de plantas, con una identidad de alrededor del 23% (Cunningham *et al.*, 1994). En el genomio de *Synechocystis* no se encuentra ninguna fase de lectura abierta que se parezca ni a *crtL* ni a *crtY*. Dado que *Synechocystis* sintetiza carotenoides cíclicos como productos finales de la ruta carotenogénica en esta cianobacteria debe de existir un gen correspondiente a una ciclasa del licopeno estructuralmente distinta a las caracterizadas hasta ahora.

Como se ha discutido previamente en el apartado 4.3., respecto de las cetolasas de β -caroteno cabe destacar que el único gen cianobacteriano aislado es el *crtO* de *Synechocystis* (caracterizado en este trabajo) y que no se parece a los de otras cetolasas (*crtW*) sino a genes de desaturasas de tipo bacteriano o *crtI* (figuras 29 y 38).

Los estudios filogenéticos revelaron el origen cianobacteriano de los cloroplastos y el linaje vía clorofitas hasta plantas superiores. Teniendo en cuenta la filogenia molecular de la biosíntesis de carotenoides, se deduce claramente un fondo común en la evolución entre plantas y cianobacterias. La mayoría de las bases estructurales para la síntesis de carotenoides en cloroplastos de plantas superiores se establecieron en las cianobacterias con sólo dos excepciones: potencialidad de sintetizar anillos ϵ y la epoxidación de la zeaxantina observada en clorofitas. En varias ocasiones las cianobacterias han adquirido nuevos genes como por ejemplo los dos de las nuevas desaturasas que reemplazan a uno único o un nuevo gen de la ciclasa del licopeno, o bien han modificado la función de los genes bacterianos. Estos hechos debieron suceder en correlación con la evolución de la fotosíntesis oxigénica. Por tanto, es tentador especular con la idea de que los genes de tipo *crtP* codifican enzimas mejor adaptadas al trabajo en organismos con fotosíntesis oxigénica que las codificadas por genes de tipo *crtI*.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha aislado una mutación en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 que confiere resistencia a los inhibidores de la ciclasa del licopeno nicotina y MPTA. La mutación es puntual y provoca un cambio de metionina a valina en la posición 209 de la ORF slI0147.
2. Se ha clonado la ORF de *Synechocystis* slI0147 y se ha determinado que codifica una proteína esencial en la cianobacteria aunque de función desconocida.
3. Se ha establecido que los promotores de los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* están sujetos a regulación por luz de manera similar. Ambos ven incrementada su expresión en condiciones de alta intensidad de luz.
4. Se han identificado secuencias homólogas entre sí en el extremo 5' de los genes *crtP* y *crtB* de *Synechocystis* que pueden ser las responsables de la respuesta de inducción que presentan los promotores de ambos genes.
5. Se ha establecido que la ORF slr0088 de *Synechocystis* es el gen que codifica la cetolasa de β -caroteno en este microorganismo.
6. Se ha determinado que la cetolasa de β -caroteno de *Synechocystis* utiliza preferentemente β -caroteno como sustrato a diferencia de las cetolasas caracterizadas previamente que utilizan también equinenona.
7. Se ha identificado la ORF slr0940 de *Synechocystis* como el gen que codifica la ζ -caroteno desaturasa. Esta enzima es homóloga a la ζ -caroteno desaturasa de plantas y diferente de la de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amann, E., Brosius, J. y Ptashne, M. (1983) Vectors bearing a hybrid *trc-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**, 167-178.
- Amann, E., Ochs, B. y Abel, K.J. (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**, 301-315.
- Anderson, S.L. y McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light requiring process. *J. Bacteriol.* **173**, 2761-2767.
- Armstrong, G.A. (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* **176**, 4795-4802.
- Armstrong, G.A. (1995) Genetic analysis and regulation of carotenoid biosynthesis: structure and function of the *crt* genes and gene products. En *Advances in Photosynthesis, Vol. 2: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. y Bauer, C.E., eds.) pp 1135-1157. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu.Rev. Microbiol.* **51**, 629-659.
- Armstrong, G.A., Alberti, M., Leach, F. y Hearst, J.E. (1989) Nucleotide sequence, organization and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 254-258.
- Armstrong, G.A. y Hearst, J.A. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* **10**, 228-237.
- Armstrong, G.A., Hundle, B.S. y Hearst, J.E. (1993) Evolutionary conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene products from photosynthetic and non photosynthetic organisms. *Methods Enzymol.* **214**, 297-311.
- Baima, S., Macino, G. y Morelli, G. (1991) Photoregulation of the *albino-3* gene in *Neurospora crassa*. *J. Photochem. Photobiol.* **11**, 107-115.
- Balsalobre, J.M., Ruiz-Vázquez, R.M. y Murillo, F.J. (1987) Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2359-2362.
- Bartley, G.E. y Scolnik, P.A. (1993) cDNA cloning, expression during development and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* **268**, 25718-25721.
- Bartley, G.E., Viitanen, P.V., Bacot, K.O. y Scolnik, P.A. (1992) A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 5036-5039.
- Bartley, G.E., Viitanen, P.V., Pecker, I., Chamovitz, D., Hirschberg, J. y Scolnik, P.A. (1991) Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6532-6536.

- Bartley, G.E., Viitanen, P.V., Pecker, I., Chamovitz, D., Hirschberg, J. y Scolnik, P.A. (1991) Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6532-6536.
- Ben-Amotz, A., Lers, A. y Avron, M. (1988) Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **86**, 1286-1291.
- Benton, W.D. y Davis, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hibridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Beyer, P., Mayer, M. y Kleinig, H. (1989) Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclization reactions in daffodil chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* **184**, 141-150.
- Bird, C.R., Ray, J.A., Fletcher, J.D., Boniwell, J.M., Bird, A.S., Teulieres, C., Blain, I., Bramley, P.M. y Schuch, W. (1991) Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *BioTechnology* **9**, 635-639.
- Bonen, L., y Doolittle, W.F. (1975) On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2310-2314.
- Botella, J.A., Murillo, F.J. y Ruiz-Vázquez, R. (1995) A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Eur. J. Biochem.* **233**, 238-248.
- Bouvier, F., d'Harlinghe, A. y Camara, B. (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 53-64.
- Bouvier, F., Huguency, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M. y Camara, B. (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* **6**, 45-54.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bramley, P.M. y Mackenzie, A. (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* **29**, 291-343. Academic Press, Inc.
- Breitenbach, J., Fernández-González, B., Vioque, A. y Sandmann, G. (1997) Higher-plant type ζ -carotene desaturase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant Mol. Biol.* (en prensa)
- Britton, G. (1983) The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press, Cambridge.
- Britton, G. (1988) Biosynthesis of carotenoids. En: *Plant pigments* (Goodwin T.W. ed.) pp 133-180. Academic Press, New York.

- Britton, G.** (1993) Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes. En *Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly* (Sundqvist, C. y Ryberg, M. eds.) pp 447-484. Academic Press, San Diego.
- Buckner, B., Kelson, T.L. y Robertson, D.S.** (1990) Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. *Plant Cell* 2, 867-876.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. y Short, J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376.
- Cai, Y. y Wolk, C.R.** (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172, 3138-3145.
- Camara, B. y Dogbo, O.** (1986) Demonstration and solubilization of lycopene cyclase from *Capsicum* chromoplast membranes. *Plant Physiol.* 80, 172-184.
- Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G. y Macino, G.** (1991) The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino-3*) reveals highly conserved regions among prenyl-transferases. *J. Biol. Chem.* 266, 5854-5859.
- Cogdell, R.** (1988) The function of pigments in chloroplasts. En *Plant Pigments* (Goowin, T.W. ed.) pp 183-255. Academic Press, London.
- Cogdell, R.J. y Frank, H.A.** (1987) How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 895, 63-79.
- Cogdell, R.J. y Gardiner, A.T.** (1993) Functions of carotenoids in photosynthesis. *Methods. Enzymol.* 214, 185-193.
- Cunningham Jr., F.X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E. y Hirschberg, J.** (1993) Cloning and functional expression in *Escherichia coli* or a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene. *FEBS Lett.* 328, 130-138.
- Chamovitz, D., Pecker, I., Sandmann, G., Böger, P. y Hirschberg, J.** (1990) Cloning a gene coding for norflurazon resistance in cyanobacteria. *Z. Naturforsch.* 45c, 482-486.
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A. y Van Arkel, G.A.** (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* 204, 185-191.
- Chauvat, F., Labarre, J. y Ferino, F.** (1988) Development of genes transfer systems for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol Biochem.* 26, 629-637.
- Chauvat, F., Ronet, P., Bottin, H. y Boussac, A.** (1989) Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: selection of mutants defective in photosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 216, 51-59.

- Davidson, E. y Cogdell, R.J. (1981) Reconstitution of carotenoids into the light-harvesting pigment-protein complex from carotenoidless mutant of *Rhodospseudomonas spheriodes* R26. *Biochim. Biophys. Acta* **635**, 295-303.
- Davies, B.H. (1976) Carotenoids. En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (T.W. Goodwin, Es.), pp 38-165, Academic Press, London.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Babcock, G.T. y McIntosh, L. (1988a) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 427-430.
- Debus, R.J., Barry, B.A., Sithole, I., Babcock, G.T. y MacIntosh, L. (1988b) Directed mutagenesis indicates that the donor to P680⁺ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry* **27**, 9071-9074.
- Demming-Adams, B. (1990) Carotenoid and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochem. Biophys. Acta* **1020**, 1-24.
- Demming-Adams, B. y Adams III, W.W. (1990) The carotenoid zeaxanthin and high-energy-state quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* **25**, 187-197.
- Devereux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequences analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids. Res.* **12**, 387-395.
- Dogbo, O. y Camara, B. (1987) Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **920**, 140-148.
- Douglas, S.E. y Turner, S. (1991) Molecular evidence for origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J. Mol. Evol.* **33**, 267-273.
- Dzelzkalns, V.A. y Bogorad, L. (1988) Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure. *EMBO J.* **7**, 333-338.
- Eastman, A. (1987) An improvement to the novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression. *BioTechniques* **5**, 730-732.
- Elhai, J. y Wolk, C.P. (1988) 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.
- Fay, R. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* **56**, 340-373.
- Ferino, F. y Chauvat, F. (1989) A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Gene* **84**, 257-266.
- Fernández-González, B., Sandmann, G. y Vioque, A. (1997) A new type of asymmetrically-acting β -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **272**, 9728-9733.

- Flores, E. y Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En *Advances in Photosynthesis, vol 1: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D.A. ed.) pp 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 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.
- Fontes, M., Ruiz-Vázquez, R. y Murillo, F.J. (1993) Growth phase dependence of activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. *EMBO J.* **12**, 1265-1275.
- Frank, H.A., Farhoosh, R., Decoster, B. y Christensen, R.L. (1992) Molecular features that control the efficiency of carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in photosynthesis. En *Research in photosynthesis, vol I* (Murata, N. ed.) pp 125-128. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Frank, H.A., Violette, C.A., Trautman, J.K., Shreve, A.P. Owens, T.G. y Albrecht, A.C. (1991) Carotenoids in photosynthesis: structure and photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **63**, 109-114.
- Fraser, P.E., Miura, Y. y Misawa, N. (1997) In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 6128-6135.
- Frickel, F. (1985) Retinoids: an overview of some natural carotenoid metabolites and their synthetic analogs. *Pure Appl. Chem.* **57**, 709-716.
- Garí, E., Toledo, J.C., Gibert, I. y Barbé, J. (1992) Nucleotide sequence of the methoxyneurosporene dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*: comparison with other bacterial carotenoid dehydrogenases. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, 103-108.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.L., Barns, S., Lane, D.J. y Pace, N.R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592.
- Giuliano, G., Barthley, G.E. y Scolnik, P.A. (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**, 379-387.
- Goodwin, T.W. (1977) The prenylipids of the membranes of higher plants. En *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (Trevini, M. y Lichtenthaler, eds.) pp 29-47. Springer, New York.
- Goodwin, T.W. (1980) The biochemistry of the carotenoids vol.1. Plants. 2^a ed. Chapman y Hall, New York.
- Gray, M.W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* **5**, 294-299.
- Grigorieva, G. y Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 367-370.

- Guerrero, M.G. y Lara, C. (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C., eds.) pp 163-186. Elsevier Science Publishers, New York.
- Hanahan, D. (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harding, R.W. y Shropshire Jr., W. (1980) Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 217-238.
- Hayes, J.M. (1983) Geochemical evidence bearing on the origin of aerobiosis, a speculative hypothesis. En *The Earth's earliest biosphere, its origins and evolution* (Schopf, J.W., ed.) pp 291-300. Princeton University Press. Princeton, N.J.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R. y Stanier, R.Y. (1979) Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 73-85.
- Hirschberh, J. y Chamovitz, D. (1994) Carotenoids in cyanobacteria. En *Advances in Photosynthesis, Vol. 1: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D., ed.) pp 559-579. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hodgson, D.A. y Murillo, F.J. (1993) Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. En *Myxobacteria II*, (Dworkin, M. y Kaiser, E. eds.) pp 157-181. Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Houssaini-Iraqi, M., David, H.L., Clavel-Sérés, S., Hilali, F. y Rastogi, N. (1993) Characterization of *car a*, *car Lep*, and *crt I* genes controlling the biosynthesis of carotenes en *Mycobacterium aurum*. *Curr. Microbiol.* **27**, 317-322.
- Huguene, P., Römer, S., Kuntz, M. y Camara, B. (1992) Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and ζ -carotene in *Capsicum* chromoplast. *Eur. J. Biochem.* **209**, 399-407.
- Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D., y Hearst, J.E. (1994) Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho 10 carotenoid genes expressed en *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 406-416.
- Jansson, C., Debus, R.J., Osiewacz, H.D., Gurevitz, M. y McIntosh, L. (1987) Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **85**, 1021-1025.
- Jones, B.L. y Porter, J.W. (1986) Biosynthesis of carotenoids in higher plants. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **3**, 295-324.
- Kajiwara, S., Kakizono, T., Saito, T., Kondo, K., Ohtani, T., Nishio, N., Nagai, S y Misawa, N. (1995) Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from *Haematococcus pluvialis*, and astaxanthin synthesis en *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* **29**, 343-352.

- Kirk, J.T.O. y Tilney-Bassett, R.A.E. (1978) En *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. 2ª ed. Elsevier North-Holland, New York.
- Kleinig, H. (1989) The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 39-59.
- Krinsky, N.I. (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* **51**, 649-660.
- Kuntz, M., Römer, S., Suire, C., Hugheney, P., Weil, J.H., Schantz, R. y Camara, B. (1992) Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*-Correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.* **2**, 25-34.
- Kyte, J. y Doolittle, R.J. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Labarre, J., Chauvat, F. y Thuriaux, P. (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **171**, 3449-3457.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laferrière, A. y Beyer, P. (1991) Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Sinapis alba* etioplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 156-163.
- Lang, H.P., Cogdell, R.J., Gardiner, A.R. y Hunter, C.N. (1994) Early steps in carotenoid biosynthesis: sequences and transcriptional analysis of the *crtI* and *crtB* genes of *Rhodobacter sphaeroides* and overexpression and reactivation of *crtI* in *Escherichia coli* and *R. sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **176**, 3859-3869.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A. y Rohmer, M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**, 271-274.
- Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J. y Sandmann, G. (1991) Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. *Z. Naturforsch.* **46c**, 1045-1051.
- Linden, H., Misawa, N., Saito, T. y Sandmann, G. (1994) A novel carotenoid biosynthesis gene coding for ζ -carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant Mol. Biol.* **24**, 369-379.
- Linden, H., Sandmann, G., Chamovitz, D., Hirschberg, J. y Böger, P. (1990) Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. *Z. Naturforsch.* **46c**, 1045-1051.
- Linden, H., Vioque, A. y Sandmann, G. (1993) Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for zeta-carotene desaturase from *Anabaena* PCC 7120 by heterologous complementation. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**, 99-104.

- Lotan, T. y Hirschberg, J. (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett.* **364**, 125-128.
- 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.
- Markwel, M.A., 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.* **180**, 152-157.
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P. y Chauvat, F. (1993) A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of de genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 905-909.
- Martínez Férez, I.M. (1994) Caracterización de genes de la carotenogenesis en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Martínez-Férez, I.M., Fernández-González, B., Sandman, G. y Vioque, A. (1994a) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Acta*, **1218**, 145-152.
- Martínez-Férez, I.M. y Vioque, A. (1992) Nucleotide sequence of the phytoene desaturase gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and characterization of a new mutation which confers resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol. Biol.* **18**, 981-983.
- Martínez-Férez, I.M., Vioque, A. y Sandmann, G. (1994b) Mutagenesis of an amino acid responsible in phytoene desaturase from *Synechocystis* for binding of the bleaching herbicide norflurazon. *Pestic. Biochem. Physiol.* **48**, 185-194.
- Masamoto, K. y Furukawa, K. (1997) Accumulation of zeaxanthin in cells of the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942 grown under high irradiance. *J.Plant.Physiol.* **151**, 257-261.
- Math, S.K., Hearst, J.E. y Poulter, C.D. (1992) The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6761-6764.
- Mayer, M.P., Nievelstein, V. y Beyer, P. (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*- a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol. Biochem.* **30**, 389-398.
- McKinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315-322.
- Misawa, N., Kajiwara, S., Kondo, K., Yokoyama, A., Satomi, Y., Saito, T., Miki, W. y Ohtani, T. (1995a) Canthaxanthin biosynthesis by the conversion of methylene to

- keto groups in a hydrocarbon β -carotene by a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 867-876.
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. y Harashima, A. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T. y Miki, W. (1995b) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**, 6575-6584.
- Montesinos, M.L., Herrero, A. y Flores, E. (1995) Amino acid transport system required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**, 3150-3157.
- Nelis, H.J. y de Leenheer, A.P. (1991) Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 181-191.
- Pearce, J., Leach, C.K. y Carr, N.G. (1969) The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 371-378.
- Pearson, W.R. y Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Mann, V., Sandmann, G., Böger, P. y Hirschberg, J. (1993) Molecular characterization of carotenoid biosynthesis in plants: the phytoene desaturase gene in tomato. En *Research in Photosynthesis vol. III* (Murata, N. ed.) pp 11-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Linden, H., Sandmann, G. y Hirschberg, J. (1992a) A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ζ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4962-4966.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Mann, V., Sandmann, G. y Böger, P. (1992b) Molecular characterization of carotenoid biosynthesis in plants: the phytoene desaturase gene in tomato. En *Research in photosynthesis vol. III* (Murata, N. ed.) pp 11-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Porter, R.D. (1986) Transformation in cyanobacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **13**, 111-132.
- Quinones, M.A. y Zeiger, E. (1994) A putative role of the xanthophyll zeaxanthin in blue light photoreception of corn coleoptiles. *Science* **26**, 558-561.
- Qureshi, N. y Porter, J.W. (1981) Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. En *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds* (Porter, J.W. y Spurgeon, S.L. eds.) vol 1, pp 47-93. Wiley, New York.

- Raisig, A., Bartley, G., Scolnik, P. y Sandmann, G. (1996) Purification in an active state and properties of the 3-step phytoene desaturase from *Rhodobacter capsulatus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokio)* **119**, 559-564.
- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J. y Hanahan, D. (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1563-1575.
- Ray J.A., Bird, C.R., Maunders, M., Grierson, D. y Schuch, W. (1987) Sequence of pTOM5, a ripening related cDNA from tomato. *Nucleic Acids. Res.* **15**, 10587-10588.
- Reddy, K.J., Masamoto, K., Sherman, D.M. y Sherman, L.A. (1989) DNA sequence and regulation of the gene (*cbpA*) encoding the 42-kilodalton cytoplasmic membrane carotenoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **171**, 3486-3493.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
- Rippka, R. (1972) Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **87**, 93-98.
- 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.
- Rock, C.D. y Zeevart, J.A.D. (1991) The ABA mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7496-7499.
- Rock, C.D., Bowlby, N.R., Hoffman-Benning, S. y Zeevart, J.A.D. (1992) The ABA mutant of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. has reduced chlorophyll fluorescence yields and reduced thylakoid stacking. *Plant Physiol.* **100**, 1414-1421.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. y Sahn, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.
- Ruiz-Vázquez, R., Fontes, M. y Murillo, F.J. (1993) Clustering and coordinated activation of carotenoid genes in *Myxococcus xanthus* by blue light. *Mol. Microbiol.* **10**, 25-34.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sandmann, G. (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur.J. Biochem.* **223**, 7-24.
- Sandmann, G. y Böger, P. (1989) Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides. En *Target sites of herbicides* (Böger, P. y Sandmann, G., eds.) pp 25-44. CRC Press, Boca Raton
- Sandmann, G., Bramley, P.M. y Böger, P. (1985) New herbicidal inhibitors of carotene biosynthesis. *Pestic. Sci.* **10**, 19-24.
- Sandmann, G., Woods, W.S. y Tuveson, R.W. (1990) Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 77-82.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schleifer, K.H. y Ludwig, W. (1989) Phylogenetic relationships among bacteria. En *The Hierarchy of Life* (Fernholm, B., Bremer, K. y Jörnvall, eds.) pp 103-117. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Schmidhauser, T.J., Lanter, F.R., Russo, V.E.A. y Yanofsky, C. (1990) Cloning, sequence and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthesis gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5064-5070.
- Schmidt, A. (1988) Sulfur metabolism in cyanobacteria. En *Methods Enzymol.* **167**, 572-583.
- Schnurr, G., Schmidt, A. y Sandmann, G. (1991) Mapping of a carotenogenic gene cluster from *Erwinia herbicola* and functional identification of six genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**, 157-162.
- Schopf, J.W., Hayes, J.M. y Walter, M.R. (1983) Evolution of the Earth's earliest ecosystem: recent progress and unsolved problems. En *The Earth's earliest biosphere, its origins and evolution* (Schopf ed.) pp 361-384. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Schwender J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K. y Rohmer, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* **316**, 73-80.
- Sherman, L., Bricker, T., Guikema, J. y Pakrasi, H. (1987) The protein composition of the photosynthetic complexes from the cyanobacterial thylakoid membrane. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y Baalen, C.V. eds.) pp 1-33. Elsevier, Amsterdam.
- Shiau, A. y Smith, J.M. (1988) Improved *cat* gene cassette for promoter analysis and genetic constructions. *Gene* **67**, 295-299.
- Shiefermann-Harms, D. (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plantarum* **69**, 561-568.

- Smart, L.B. y McIntosh, L. (1993) Genetic inactivation of the *psaB* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 disrupts assembly of photosystem I. *Plant. Mol. Biol.* **21**, 177-180.
- Smart, L.B., Anderson S.L. y McIntosh, L. (1991) Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J.* **10**, 3289-3296.
- Smart, L.B., Bowlby, N.R., Anderson, S.L., Sithole, I. y McIntosh, L. (1994) Genetic manipulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Development of strains lacking Photosystem I for the analysis of mutations in Photosystem II. *Plant Physiol.* **104**, 349-354.
- Smith, A.J. (1982) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N.G. y Whitton, B.A., eds.) pp 47-85. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 225-291.
- Stewart, W.D.P. (1980) Some aspect of structure and function in N₂ fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**, 497-536.
- Sun, Z., Gantt, E. y Cunningham Jr., F.X. (1996) Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24349-24352.
- Tabata, K., Oshida, S., Nakahara, T y Hoshino, T. (1994) A carotenogenic gene cluster exists on a large plasmid in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **341**, 251-155.
- Tandeau de Marsac, N. y Houmard, J. (1987) Advances in cyanobacterial molecular genetics. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C., eds.) pp 251-302. Elsevier Science Publishers, New York.
- Thiel, T y Poo, H. (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**, 5743-5746.
- Vermaas, W.F.J., Rutherford, A.W., y Hansson, O. (1988) Site-directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: donor D is a tyrosine residue in the D2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8477-8481.
- Vermaas, W.F.J., Williams, J.G.K., Rutherford, A.W., Mathis, P y Arntzem. C.J. (1986) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9474-9477.
- Vioque, A. (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6331-6337.

- Walter, M.R. (1987) Archean stromatolites: evidence of The Earth's earliest benthos. En *The Earth's earliest biosphere, it's origins and evolution* (Schopf, J.W., ed.) pp 187-212. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Wilmotte, A. (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. En *Advances in Photosynthesis, Vol. 1: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D.A., ed.) pp 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Williams, J.G.K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering. *Methods Enzymol.* **167**, 766-778.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Wolfe, G.R., Cunningham, F.X., Durnford, D., Green, B.R. y Gantt, E. (1994) Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation. *Nature* **367**, 566-568.
- 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.
- 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.
- Yen, H.C. y Marrs, B. (1976) Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **126**, 619-629.

Blanca Maria Fernández González
Identificación y caracterización de genes de la
proteína de choque térmico en la cianobacteria
Synechocystis sp. PCC 6803
APTO CON LAUDE

27

MARZO

98

~~A. H. H. H.~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

[Signature]

[Signature]

Blanca Fernández



501065104

FBI ETD / 392

1065104