

REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN LA
CIANOBACTERIA FORMADORA DE HETEROCISTOS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA *Anabaena sp. PCC 7120*

Depositado en *Dpto. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular*
de la *Facultad de Biología*

de esta Universidad desde el día *28-X-96* Queda registrada esta Tesis Doctoral
hasta el día *14-XI-96* al folio *78* número *120* del libro

Sevilla *28 de Noviembre* de 19*96* correspondiente.

EL DIRECTOR DE *Dpto. de Bioquímica Vegetal y Biología Ual.*

Sevilla, *25-10-96*
El Jefe del Negociado de Tesis,

Florencia Raffalli

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Biología por el Licenciado

José Enrique Frías Sánchez

[Signature]
Sevilla, Noviembre de 1996

Director:

[Signature]

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

Directora:

[Signature]

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

Tutor:

[Signature]

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

R. 14221





T.D. 359

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Regulación de la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria formadora de heterocistos Anabaena sp. PCC 7120 sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado: José Enrique Frías Saúches

Sevilla, a 7 de Febrero de 1997

A mi madre (in memoriam).
A Inma

Esta tesis se ha realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla e Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del C.S.I.C. gracias a una beca de la Fundación Cámara-Urzáiz y a la ayuda recibida del grupo de investigación 3057 de la Junta de Andalucía.

He de agradecer en sumo grado el apoyo constante que he recibido de mis directores de tesis, los Dres. Enrique Flores García y Antonia Herrero Moreno. De ellos he recibido muchas reprimendas, casi siempre justificadas, con el único fin de adiestrarme como científico y como persona. De ellos valoro sobre todo la comprensión que demostraron en los momentos críticos que tuve durante este periodo y que me permitió superarlos.

No quiero olvidar ni olvido a mis compañeros, Alicia, Ángel, Belén e Ignacio. Todos ellos constituyeron para mí una fuente inapreciable de estímulos constantes; a ellos fui con mis problemas (que no fueron pocos) y ellos me escucharon y me ayudaron en la medida de sus posibilidades. Gracias.

Llegaron nuevas promesas al laboratorio, no menos apreciadas por mí, como son Maria Luz, Maria Félix, Maria José, Luis Manuel "Mamé" y Ana Valladares. A todos ellos agradezco que me hayan ofrecido su amistad y que me hayan soportado, que no es poco, aunque en ciertos momentos surgieran fricciones que pronto se solucionaron. Echaré de menos las maratonianas charlas que tuve con Maria Luz, mi compañera de enfrente, de quien me siento afortunado de haber conocido.

A todos los compañeros del Departamento, y en especial a Maribel, José Carlos, Paco y Ana Peciña, también les quiero dar las gracias por toda la ayuda que he recibido de ellos y por haber contribuido a un clima agradable de convivencia en el Departamento.

También he de dar las gracias al Dr. Peter Wolk por haberme enviado el plásmido pRL822RM2, que ha sido esencial para parte del trabajo que se presenta.

También he de agradecer el comportamiento que ha tenido mi "Super 5", con él he dado 3 vueltas al mundo, 118.000 km exactamente, en los cinco años de Tesis y él ha sufrido mucho, sobre todo cuando todo salía mal e iba de regreso a mi pueblo natal, Arahal, la flor de la Campiña.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCION	11
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	13
1.2. FIJACIÓN DE DINITRÓGENO	14
1.2.1. La nitrogenasa	15
1.2.2. Estructura genética del sistema de fijación de dinitrógeno	16
1.2.3. El heterocisto	17
1.3. ASIMILACIÓN DE NITRATO Y NITRITO EN CIANOBACTERIAS	19
1.3.1. Entrada de nitrato y nitrito al interior celular	19
1.3.2. La nitrato reductasa	21
1.3.3. La nitrito reductasa	21
1.3.4. Estructura genética del sistema de asimilación de nitrato	22
1.4. ASIMILACIÓN DE AMONIO EN CIANOBACTERIAS	22
1.4.1. Transporte de amonio	23
1.4.2. Incorporación del amonio a esqueletos carbonados: la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa	23
1.5. REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN CIANOBACTERIAS	24
1.5.1. Regulación de la fijación de nitrógeno	24
1.5.2. Regulación de la asimilación de nitrato y nitrito	25
1.5.3. La proteína P _{II}	26
1.5.4. La proteína NtcA	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	31
2.1.1. Cianobacterias	31
2.1.1.1. Recogida y lavado de células	32
2.1.1.2. Curvas de crecimiento	32
2.1.2. Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	33
2.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DE CONSUMO DE NITRATO	33
2.2.1. Actividad nitrato reductasa	33

2.2.2. Actividad nitrito reductasa	34
2.2.3. Actividad glutamina sintetasa	35
2.2.4. Actividad nitrogenasa	35
2.2.5. Determinación de consumo de nitrato	36
2.3. MÉTODOS GENÉTICOS	37
2.3.1. Conjugación <i>E. coli</i> - <i>Anabaena</i> sp.	37
2.3.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	38
2.4. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA	39
2.4.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	39
2.4.2. Aislamiento de DNA total de <i>Anabaena</i> sp.	40
2.4.3 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
2.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	41
2.4.5. Extracción de DNA de geles de agarosa	41
2.4.6. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas (análisis de Southern)	41
2.4.7. Secuenciación de DNA	42
2.5. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA	43
2.5.1. Restricción del DNA	43
2.5.2. Desfosforilación	44
2.5.3. Relleno de extremos 5' protuberantes	44
2.5.4. Ligación de fragmentos de DNA	44
2.5.5. Marcaje radiactivo de sondas de DNA	44
2.6. GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE SUBGENOTECAS	45
2.6.1. Generación de subgenotecas	45
2.6.2. Análisis de subgenotecas	45
2.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA	46
2.7.1. Aislamiento de RNA total	46
2.7.2. Ensayos de extensión del cebador	48
2.7.3. Análisis de "Northern"	48
2.7.4. Hibridación usando RNA como sonda	49
2.7.5. "Slot Blot"	50
2.8. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES	51
2.8.1. Determinación de proteína	51
2.8.2. Determinación de clorofila	51
3. RESULTADOS	53
3.1. GENES DE ASIMILACIÓN DE NITRATO EN <i>Anabaena</i> sp.	

	<i>Índice</i>
PCC 7120	55
3.1.1. Clonación	55
3.1.2. Implicación de la región clonada en la asimilación de nitrato	59
3.1.3. Mutantes en el gen <i>nrtA</i>	63
3.1.4. Estudios de expresión del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato	67
3.1.5. Análisis de la región genómica anterior al operón <i>nir</i>	74
3.2. DISTRIBUCIÓN DEL GEN <i>ntcA</i> EN LAS CIANOBACTERIAS	81
3.2.1. Clonación y secuenciación de los genes <i>ntcA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	81
3.2.2. Posible presencia del gen <i>ntcA</i> en otras cianobacterias	84
3.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>ntcA</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	86
3.3.1. Generación de un mutante en el gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	86
3.3.2. Crecimiento del mutante CSE2 con diversas fuentes de nitrógeno	95
3.3.3. Actividades nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa y nitrogenasa de la estirpe CSE2	89
3.3.4. Expresión de los genes <i>nir</i> , <i>glnA</i> y <i>nif</i> en la estirpe CSE2	90
3.3.5. Requerimiento de <i>ntcA</i> para el desarrollo de heterocistos	94
3.3.6. Análisis de la expresión del gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	96
3.3.7. El fenotipo pleiotrópico de la estirpe CSE2 es consecuencia de la mutación en el gen <i>ntcA</i>	96
3.3.8. Efecto de la alteración de la expresión de <i>ntcA</i>	100
4. DISCUSIÓN	105
4.1. ASIMILACION DE NITRATO	107
4.2. REGULACIÓN MEDIADA POR <i>ntcA</i>	112
5. CONCLUSIONES	121
6. BIBLIOGRAFÍA	125



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSE2 y pCSE5, que contienen parte de la región de asimilación de nitrato de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	56
Figura 2.	Secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA del genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 que comprende la región C-terminal del gen <i>nir</i> y el gen <i>nrtA</i> completo. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida en cada caso.	57
Figura 3.	Comparación de la secuencia del producto del gen <i>nrtA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 con la de las proteínas NrtA de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 y <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y la proteína NasF de <i>Klebsiella pneumoniae</i> M5al.	58
Figura 4.	Esquema de la construcción del plásmido pCSE21aB, usado para la generación de la estirpe CSE1.	60
Figura 5.	Análisis de la estructura genómica de la estirpe CSE1.	61
Figura 6.	Crecimiento de la estirpe mutante CSE1 en medio con nitrato o con amonio.	62
Figura 7.	Esquema de la construcción de los plásmidos pCSE44B y pCSE45B, usados para la generación de las estirpes CSE9 y CSE10, respectivamente.	64
Figura 8.	Análisis de la estructura genómica de las estirpes CSE9 y CSE10.	65
Figura 9.	Crecimiento de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10 en medio con nitrato, sin nitrógeno combinado o con amonio.	66
Figura 10.	Estudio de la expresión de los genes <i>nir</i> y <i>nrtA</i> mediante análisis de "Northern".	68
Figura 11.	Expresión del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato en la estirpe mutante CSE1 y en <i>Anabaena</i> sp. EF116.	69
Figura 12.	Niveles de RNAm de diferentes regiones del operón <i>nir</i> .	70
Figura 13.	Determinación del inicio de transcripción del gen <i>nir</i> .	71
Figura 14.	Secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA que contiene la región líder del gen <i>nir</i> y la zona N-terminal de dicho gen. Se muestra asimismo la secuencia de aminoácidos del fragmento correspondiente de la proteína Nir.	72
Figura 15.	Esquema de la construcción del plásmido pCSE88B, usado para la generación de la estirpe CSE18.	73
Figura 16.	Secuencia de nucleótidos de la región de DNA que contiene a la <i>orf136</i> y a la <i>orf398</i> . Se muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas deducidas en cada caso.	74

Figura 17.	Estudio de la expresión de la <i>orf136</i> y de la <i>orf398</i> , mediante análisis de "Northern".	76
Figura 18.	Determinación del inicio de transcripción de la <i>orf136</i> .	77
Figura 19.	Esquema de la construcción de los plásmidos pCSE78B y pCSE81B, usados para la generación de las estirpes CSE16 y CSE17, respectivamente.	78
Figura 20.	Análisis de la estructura genómica de las estirpes CSE16 y CSE17.	79
Figura 21.	Mapa de restricción de la región del genomio de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 que contiene al gen <i>ntcA</i> .	81
Figura 22.	Secuencia de nucleótidos de la región del genomio de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 que contiene al gen <i>ntcA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	82
Figura 23.	Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSE4a y pCSE4, que contienen el gen <i>ntcA</i> , o parte del mismo, de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	83
Figura 24.	Secuencia de nucleótidos de la región del genomio de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 que contiene al gen <i>ntcA</i> y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	84
Figura 25.	Comparación de las secuencias de los productos de los genes <i>ntcA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	85
Figura 26.	Presencia de secuencias de DNA homólogas al gen <i>ntcA</i> en otras cianobacterias.	85
Figura 27.	Esquema de la construcción del plásmido pCSE35, usado para la generación de la estirpe CSE2.	87
Figura 28.	Análisis de la estructura genómica de las estirpes CSE2 y CSE3.	88
Figura 29.	Crecimiento de la estirpe mutante CSE2 en medio con nitrato, sin nitrógeno combinado o con amonio.	89
Figura 30.	Análisis de "Northern" de la expresión del operón <i>nir</i> , del operón <i>nifHDK</i> y del gen <i>glnA</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.	91
Figura 31.	Determinación de los sitios de inicio de transcripción del gen <i>glnA</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.	92
Figura 32.	Determinación del inicio de transcripción del gen <i>nir</i> en la estirpe mutante CSE2.	93

Figura 33.	Fotografías al microscopio óptico de filamentos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de la estirpe mutante CSE2 incubadas en medio sin nitrógeno combinado.	94
Figura 34.	Análisis de la expresión del gen <i>hetR</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.	95
Figura 35.	Estudio de la expresión de <i>ntcA</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, mediante análisis de "Northern".	96
Figura 36.	Esquema de la construcción del plásmido pCSE36B, usado para la generación de la estirpe CSE5.	98
Figura 37.	Análisis de la estructura cromosómica de la estirpe CSE5 en la región del gen <i>ntcA</i> .	99
Figura 38.	Crecimiento de la estirpe mutante CSE5 en medio con nitrato, sin nitrógeno combinado o con amonio.	103
Figura 39.	Estructura del plásmido pCSE62 y estructura genética de la estirpe CSE15 en la región <i>ntcA</i> .	101
Figura 40.	Análisis de "Northern" de la expresión de <i>ntcA</i> en la estirpe CSE15.	102
Figura 41.	Estructura de la región genómica de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 donde se localiza el operón de asimilación de nitrato.	107
Figura 42.	Comparación de la secuencia del posible promotor de la <i>orf136</i> con las de algunos promotores constitutivos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y con la del promotor tipo consenso σ^{70} de <i>E. coli</i> .	112
Figura 43.	Secuencia de nucleótidos de las regiones de DNA situadas delante del inicio de transcripción correspondiente al RNA _I del gen <i>glnA</i> y del operón <i>nir</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120. Se muestra asimismo la secuencia de DNA consenso para los promotores regulados por NtcA de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (Luque <i>et al.</i> , 1994a).	116
Figura 44.	Sitios de inicio de la transcripción del gen <i>glnA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	33
Tabla 2.	Identificación de genes de asimilación de nitrato en la región del genomio de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonada en pCSE2 y pCSE5	56
Tabla 3.	Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de la estirpe mutante CSE1.	63
Tabla 4.	Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10.	66
Tabla 5.	Tasa de consumo de nitrato de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10.	67
Tabla 6.	Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de la estirpe mutante CSE18.	74
Tabla 7.	Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes mutantes CSE16 y CSE17.	80
Tabla 8.	Niveles de actividad de algunos enzimas implicados en la asimilación de nitrógeno en la estirpe mutante CSE2.	90
Tabla 9.	Niveles de expresión de los genes <i>ntcA</i> y <i>nir</i> y de actividad nitrato reductasa en la estirpe CSE15.	103

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
ATCC	Colección Norteamericana de Cultivos Tipo
Bisacrilamida	N.N',-Bis-metilén-acrilamida
Cm	Cloranfenicol
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Desoxiadenosín-5'-trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
E	Einstein
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
Em	Eritromicina
Etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio
FMN	Flavín mononucleótido
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad terrestre
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	Isopropil-β-tiogalactopiranósido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
K_s	Constante de semisaturación
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nm	Neomicina
N-NEDA	N-(1-naftil)-etilendiamín-dihidrocloreuro

ORF	Pauta abierta de lectura
p/v	Relación peso/volumen
pb	par de bases
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur
prot.	Proteína
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm	Estreptomicina
Sp.	Espectinomicina
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
Tricina	N-Tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
tRNA	Ácido ribonucleico transferente
U	Unidad enzimática
v/v	Relación volumen/volumen
W	Vatio
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosido

Bases nitrogenadas

A	Adenina	G	Guanina
C	Citosina	T	Timina

Aminoácidos

A	Ala	alanina	L	Leu	leucina
R	Arg	arginina	K	Lys	lisina
N	Asn	asparagina	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. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos que, en una organización procariótica, realizan una fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Se ha postulado que la producción fotosintética de oxígeno por parte de las cianobacterias y sus ancestros en el período Precámbrico jugó un papel esencial en la formación de la actual atmósfera terrestre oxidante (Buick, 1992) y condicionó la evolución del resto de grupos de seres vivos. Por otra parte, el análisis cada vez más extenso de secuencias tanto del genomio nuclear como cloroplástico de plantas evidencia un origen cianobacteriano de los cloroplastos (Giovannoni *et al.*, 1988; Douglas y Turner, 1991), apoyándose así la teoría del endosimbionte. Según esta teoría, los actuales cloroplastos procederían de un ancestro cianobacteriano incorporado en la célula eucariótica vegetal en un momento determinado de la evolución de estas últimas (Gray *et al.*, 1989). Por las características de su envuelta celular las cianobacterias han de considerarse bacterias Gram negativas (Wolk, 1980) mientras que, filogenéticamente, constituyen un grupo coherente de organismos dentro de las eubacterias (Woese, 1987).

Estos microorganismos se encuentran prácticamente en todos los ecosistemas en los que se han buscado (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993), teniendo una gran importancia ecológica. Por ejemplo, las cianobacterias unicelulares suponen entre el 10 y el 60% de la productividad primaria en diferentes zonas de los océanos. Aunque todas las cianobacterias son capaces de vivir autotróficamente, algunas de ellas también lo pueden hacer con distintos grados de heterotrofia (Rippka *et al.*, 1979; Smith, 1982). La fijación de CO₂ tiene lugar fundamentalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin, mientras que la asimilación de azúcares se realiza mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Las cianobacterias presentan un ciclo de Krebs incompleto por falta de los enzimas α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, lo que le da una función más anabólica que catabólica a la parte del ciclo presente en estos organismos (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Las cianobacterias pueden asimilar diferentes fuentes de nitrógeno, siendo el nitrato una fuente de nitrógeno ampliamente utilizada. No obstante, las cianobacterias también pueden asimilar nitrito, amonio y, en algunos casos, la urea. Además, muchas cianobacterias tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico o dinitrógeno, pudiéndolo hacer algunas de ellas en condiciones aeróbicas (Wolk, 1980; Flores y Herrero, 1994).

Un aspecto interesante de las cianobacterias es su capacidad de diferenciación celular. Así, en algunas especies filamentosas algunas células del filamento se diferencian para dar lugar a células especializadas en la fijación de dinitrógeno (los heterocistos) o para constituir estructuras de resistencia (los akinetos) o de reproducción

(hormogonios) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Wolk, 1980; Buikema y Haselkorn, 1993). Además, algunas cianobacterias presentan la capacidad de adaptación cromática o regulación de la síntesis de pigmentos de acuerdo con la longitud de onda de la luz incidente (Bogorad, 1975). Todas estas propiedades hacen de las cianobacterias organismos modelo para el estudio de fenómenos biológicos de gran interés.

Las cianobacterias se agrupan, según la clasificación taxonómica más aceptada (Rippka *et al.*, 1979), en cinco Secciones: las Secciones I y II engloban cianobacterias unicelulares con división binaria o múltiple, respectivamente, la Sección III agrupa cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos y las Secciones IV y V engloban estirpes filamentosas que desarrollan heterocistos, sin o con ramificaciones verdaderas, respectivamente. Sólo la Sección II, por un lado, y las Secciones IV y V, conjuntamente, parecen ser grupos filogenéticamente coherentes (Giovannoni *et al.*, 1988).

Este trabajo se ha centrado en la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120, cianobacteria filamentosas no ramificada formadora de heterocistos (Sección IV), y por tanto con capacidad de fijar dinitrógeno en condiciones aeróbicas. *Anabaena* sp. PCC 7120 no es transformable, pero sí capaz de recibir material genético exógeno desde *Escherichia coli* mediante conjugación interespecífica (Wolk *et al.*, 1984), lo que ha permitido un notable avance en el estudio genético de dicha estirpe. *Anabaena* sp. PCC 7120 incorpora a su genomio el material genético exógeno principalmente mediante recombinación homóloga simple, lo que dificulta la generación de mutantes dirigidos. El desarrollo de vectores portadores del gen *sacB*, letal para las cianobacterias en presencia de sacarosa, que permite la selección positiva de dobles recombinantes (Cai y Wolk, 1990), ha llevado a un mayor desarrollo de la genética de dicha cianobacteria. La capacidad de *Anabaena* sp. PCC 7120 de desarrollar heterocistos y el avance de la genética molecular de esta cianobacteria la han convertido en un organismo modelo para el estudio de tal proceso.

1.2. FIJACIÓN DE DINITRÓGENO EN CIANOBACTERIAS

La capacidad de fijar el dinitrógeno está presente en las cinco Secciones de cianobacterias. No obstante, y dada la extrema labilidad frente al oxígeno (tanto el del medio externo como el generado intracelularmente en la fotosíntesis oxigénica) del sistema enzimático responsable de dicho proceso, las cianobacterias fijadoras aeróbicas han desarrollado distintas estrategias encaminadas a la creación de un ambiente microaeróbico intracelular adecuado para un correcto funcionamiento de dicho sistema. Para ello, algunas cianobacterias han recurrido a la separación espacial de la fotosíntesis y la fijación de dinitrógeno, otras separan ambos procesos en el tiempo, de modo que la fotosíntesis se realiza de día y la fijación de dinitrógeno de noche, y algunas

cianobacterias unicelulares realizan ambos procesos simultáneamente utilizando mecanismos de protección hasta ahora desconocidos (Flores y Herrero, 1994). Sin duda, el procedimiento de protección más sofisticado es el de separación espacial, consistente en la diferenciación irreversible de algunas células del filamento en heterocistos (Wolk, 1982).

1.2.1. La nitrogenasa

El complejo enzimático de la nitrogenasa cataliza la reducción concomitante de dinitrógeno y protones mediante el aporte de 8 electrones por cada dos moléculas de amonio y una de hidrógeno generadas (Lowe *et al.*, 1985). La reacción conlleva el gasto de ATP (entre 15 y 20 moléculas). Dicho complejo enzimático está integrado por dos componentes proteicos. Uno de ellos es la dinitrogenasa (Mo-Fe proteína), que es un heterotetrámero de aproximadamente 226 kDa con estructura $\alpha_2\beta_2$, cifrado por los genes *nifD* y *nifK*, que contiene Mo, Fe y S (organizados en 4 centros 4Fe-4S y dos cofactores de hierro y molibdeno) y que cataliza la reducción de dinitrógeno y de los protones hasta amonio e hidrógeno, respectivamente. El otro componente es la dinitrogenasa reductasa (Fe proteína), un homodímero de 66 kDa, cifrado por el gen *nifH*, que media la transferencia de electrones desde el donador de electrones exógeno hasta la dinitrogenasa (Wolk *et al.*, 1994). Ambos componentes son lábiles en presencia de oxígeno y dan reacción inmunológica cruzada entre distintas especies de cianobacterias, y también entre cianobacterias y otras bacterias fijadoras de dinitrógeno (Stewart, 1980), lo que permitió deducir, hace ya años, que el complejo nitrogenasa de cianobacterias es homólogo al de otros organismos diazotróficos. El donador de electrones a la nitrogenasa es la ferredoxina [2Fe-2S] determinada por el gen *fdxH* (Böhme y Haselkorn, 1988; Schrautemeier y Böhme, 1992). Esta ferredoxina se describió primero como específica del heterocisto (Schrautemeier y Böhme, 1985) pero se ha encontrado posteriormente en cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno pero no formadoras de heterocistos (Schrautemeier *et al.*, 1994). En condiciones de deficiencia de hierro, el donador de electrones a la nitrogenasa podría ser la flavodoxina. Recientemente se ha clonado el gen de una piruvato-flavodoxina oxidorreductasa de *Anabaena* sp. PCC 7120, *nifJ*, que se requiere para el crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro y nitrógeno combinado (Bauer *et al.*, 1993).

Anabaena variabilis, además de la nitrogenasa dependiente de Mo determinada por *nifHDK* que se expresa en los heterocistos (Herrero y Wolk, 1986), tiene capacidad para sintetizar otras dos nitrogenasas diferentes: una de ellas se expresa en medios sin Mo, con o sin V, en condiciones de aerobiosis y es homóloga a la nitrogenasa dependiente de V de *Azotobacter vinelandii* (Thiel, 1993) y la otra se expresa en

medios con Mo, en anaerobiosis, tanto en células vegetativas como en heterocistos (Schrautemeier *et al.*, 1995; Thiel *et al.*, 1995).

Como se ha mencionado anteriormente la reacción de la nitrogenasa conlleva un gran gasto de ATP y poder reductor. Aunque no está claro el origen fisiológico de ellos, se acepta que el poder reductor producido por el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato pueda ser transferido desde el NADPH, generado en este ciclo, a la ferredoxina, (el donador inmediato a la nitrogenasa), con la posible participación del fotosistema I. Además, la ferredoxina puede reducirse vía fotosistema I utilizándose como donador de electrones el hidrógeno producido por la nitrogenasa (Stewart, 1986). El ATP puede generarse mediante fotofosforilación cíclica alrededor del fotosistema I y por fosforilación oxidativa (Stewart, 1980; Bothe, 1982).

Ya se ha mencionado que la reacción de la nitrogenasa conlleva la producción de hidrógeno, además de la de amonio, con la consiguiente disminución de la eficiencia de la reacción. Parte del ATP y poder reductor empleados en la síntesis de hidrógeno es recuperado por una hidrogenasa (que contiene Ni) presente en el heterocisto. Por acción de la hidrogenasa, los electrones del hidrógeno se ceden a las cadenas transportadoras de electrones fotosintética y respiratoria, con lo que se estimula, además, el consumo de oxígeno por respiración, representado así una forma adicional de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno (Zhang *et al.*, 1984; Pederson *et al.*, 1986).

1.2.2. Estructura genética del sistema de fijación de dinitrógeno

Los genes conocidos que están presentes en la región *nif* del genoma del heterocisto de *Anabaena* sp. PCC 7120 son (en dirección 5' a 3'): *nifB*, *fdxN*, *nifS* y *nifU* (Mulligan y Haselkorn, 1989); *nifH*, *nifD* y *nifK* (Mazur *et al.*, 1980; Rice *et al.*, 1982); *nifE*, *nifN*, *nifX*, una ORF no identificada y *nifW* (Haselkorn, 1992; Haselkorn y Buikema, 1992); dos ORFs no requeridas para la fijación de nitrógeno y *fdxH* (Böhme y Haselkorn, 1988). Los distintos genes *nif* son homólogos a los correspondientes de *Klebsiella pneumoniae*.

Dos de estos genes están interrumpidos, en las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120, por sendos fragmentos de DNA que son eliminados del cromosoma durante las últimas fases de la diferenciación del heterocisto (Golden *et al.*, 1985, 1988). Estas excisiones son necesarias pues permiten la transcripción como operones completos de los agrupamientos *nifHDK* (Haselkorn *et al.*, 1983) y *nifB-fdxN-nifS-nifU* (Mulligan y Haselkorn, 1989). El que interrumpe al operón *nifHDK* es un fragmento de 11 kb situado en el gen *nifD*, el cual se excinde mediante recombinación entre dos secuencias repetidas directas de 11 pb por la acción de la recombinasa XisA. El gen *xisA* se sitúa en el fragmento de 11 kb y su mutación produce un fenotipo Nif⁻ pero no impide el desarrollo del heterocisto (Lammers *et al.*, 1986, 1990; Golden y Wiest,

1988). El fragmento que interrumpe al otro operón se sitúa en el gen *fdxN*, que cifra una ferredoxina [4Fe-4S] de función desconocida, tiene un tamaño de 55 kb y se excinde por recombinación entre dos secuencias repetidas de 5 pb catalizada por la recombinasa XisF. El gen *xisF* se sitúa en el fragmento de 55 kb y su mutación también provoca un fenotipo Nif⁻ (Golden *et al.*, 1987; Golden *et al.*, 1988; Carrasco *et al.*, 1994). La presencia de los elementos de 11 y 55 kb, que se encuentran en el cromosoma las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120, no es común a todas las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno. Así, las hay que no presentan el elemento de 55 kb (caso de *Anabaena variabilis*) y otras que no presentan el elemento de 11 kb (caso de *Fischerella* sp. ATCC 27929 y cianobacterias fijadoras no formadoras de heterocistos). Recientemente se ha identificado un nuevo fragmento de 10,5 kb, localizado en el gen *hupL* (que cifra la subunidad mayor de una hidrogenasa anclada en la membrana del heterocisto), que se excinde tras la eliminación del nitrógeno combinado del medio (Matveyev *et al.*, 1994; Carrasco *et al.*, 1995). Parece ser que la excisión tiene lugar por recombinación específica entre dos secuencias repetidas directas de 16 pb catalizada por una proteína denominada XisC (Carrasco *et al.*, 1995).

La nitrogenasa dependiente de V de *Anabaena variabilis* está cifrada, en parte, por el agrupamiento de genes *vnfDGK*, homólogo al que determina la correspondiente nitrogenasa dependiente de V de *Azotobacter vinelandii*. En *Anabaena variabilis* los genes *vnfD* y *vnfG* están fusionados (Thiel, 1993).

En *Nostoc commune* se ha clonado un gen, *glbN*, situado entre *nifH* y *nifU*, que cifra una hemoproteína que se expresa en microaerobiosis y deficiencia de nitrógeno (Potts *et al.*, 1992), pero cuya función se desconoce.

1.2.3. El heterocisto

Como ya se ha mencionado con anterioridad en esta Introducción, el heterocisto es una célula especializada en la fijación de dinitrógeno que se encuentra en algunas cianobacterias filamentosas. Los heterocistos se diferencian a intervalos semirregulares a lo largo del filamento en respuesta a la ausencia de nitrógeno combinado (Wolk, 1989). El heterocisto aporta el nutriente nitrogenado a todas las células del filamento, para lo cual se requiere una comunicación intercelular entre heterocistos y células vegetativas que implica intercambio de metabolitos. Las peculiares características del heterocisto van encaminadas a la creación del ambiente reductor, con baja tensión de oxígeno, necesario para el desarrollo de la actividad nitrogenasa y para aumentar la eficacia del proceso de fijación. Entre tales características cabe destacar: (1) presencia de una barrera de permeabilidad a distintos gases, entre ellos el oxígeno, constituida por una capa externa de polisacáridos y una capa interna de glucolípidos presentes en la pared celular; (2) un aparato fotosintético modificado carente de actividad del

fotosistema II, lo que evita la producción de oxígeno por fotólisis del agua; (3) altas actividades de respiración, de consumo de hidrógeno y de catabolismo de azúcares y (4) incapacidad para la fijación de anhídrido carbónico mediante el ciclo de Calvin (Wolk *et al.*, 1994).

El heterocisto necesita el aporte, por parte de las células vegetativas, de compuestos reducidos de carbono que serían fuente de electrones para la fijación de dinitrógeno y de esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno fijado. Aunque la naturaleza de tales compuestos es prácticamente desconocida, se ha propuesto a la alanina y algunos azúcares como candidatos para tal función (Jüttner, 1983). Por otra parte, el nitrógeno fijado en el heterocisto se transfiere a las células vegetativas en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1974). Se considera a la glutamina como un posible vehículo de nitrógeno combinado desde los heterocistos hasta las células vegetativas, dada la elevada actividad glutamina sintetasa del heterocisto y la capacidad de producción de glutamina de heterocistos aislados. Sin embargo, tanto la naturaleza exacta de los aminoácidos transferidos como el mecanismo de transferencia se desconocen.

El proceso de desarrollo de la célula vegetativa a heterocisto implica tanto la activación de la expresión de determinados genes (por ej., los que cifran la nitrogenasa) como el cese de la expresión de otros (por ej., los genes de la RuBisCo -ribulosa bisfosfato carboxilasa-, enzima que lleva a cabo la fijación de CO₂) lo que conduce a profundos cambios tanto en el metabolismo como en la estructura de la célula diferenciada. Se han identificado algunos genes implicados en la diferenciación del heterocisto. Como ya se ha mencionado anteriormente, los heterocistos aparecen a intervalos semirregulares en el filamento. Se han descrito genes que deben estar implicados en el establecimiento de este patrón, ya que su mutación provoca una modificación del mismo. Este es el caso del gen *patA* (Liang *et al.*, 1992) cuya mutación produce filamentos con heterocistos terminales pero no intercalares. Por otra parte, hay genes cuya mutación provoca que no se lleguen a formar heterocistos maduros en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, como es el caso del gen *devA*, cuyo producto podría constituir la subunidad de unión de ATP ("conserved component") de un sistema de transporte del tipo "ABC" (de "ATP-binding cassette") dependiente de proteína de unión (Maldener *et al.*, 1994). Otro de tales genes es *hepA*, cuyo producto, también un "conserved component" de transporte, se requiere para la síntesis o estabilización de la capa de polisacáridos de la envuelta del heterocisto, provocando su mutación un fenotipo de incapacidad de fijación de dinitrógeno en aerobiosis (Wolk *et al.*, 1988).

La mutación de los genes *hetR* (Buikema y Haselkorn, 1991), *hetN* (Black y Wolk, 1994), *hepP* (Fernández-Piñas *et al.*, 1994) o *hetC* (Khudyakov y Wolk, 1994) anula o, en algunos casos, retrasa notablemente el desarrollo de los heterocistos. El gen

hetR parece ser clave para tal proceso, ya que su mutación impide la aparición de signo alguno de diferenciación. Su expresión se incrementa rápidamente tras transferir las células a medios sin nitrógeno combinado, expresándose unas 20 veces más en células que se diferenciarán a heterocistos que en las células vegetativas no diferenciadas (Black *et al.*, 1993). Sin embargo, la función del gen *hetR* no es específica para los heterocistos ya que se ha comprobado que en *Nostoc ellipsosporum* también se requiere para el desarrollo de los akinetos (Leganés *et al.*, 1994). La inducción de la expresión de *hetR* en *Anabaena* sp. PCC 7120 requiere que el gen esté intacto, lo cual indica su participación en un circuito de autorregulación (Black *et al.*, 1993). Cuando este gen se coloca en un plásmido capaz de replicarse en *Anabaena* sp. PCC 7120, se producen heterocistos en medios con nitrato, donde, normalmente, apenas se forman, y en medios sin nitrógeno combinado se producen dúos o tríos de heterocistos adyacentes (Buikema y Haselkorn, 1991). Se piensa, por tanto, que el producto del gen *hetR* es un regulador positivo necesario para la diferenciación.

1.3. ASIMILACIÓN DE NITRATO Y NITRITO EN CIANOBACTERIAS

El nitrato es una fuente de nitrógeno ampliamente utilizada por las cianobacterias. La asimilación de nitrato implica tres fases sucesivas: (1) entrada del anión en la célula; (2) reducción intracelular hasta amonio mediante la acción sucesiva de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa y (3) incorporación del amonio a esqueletos carbonados mediante el ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa (ciclo GS-GOGAT).

1.3.1. Entrada de nitrato y nitrito al interior celular

En las cianobacterias, el nitrato entra en la célula mediante dos mecanismos: uno de baja afinidad, descrito en *Synechococcus* sp. PCC 7942, que actúa a concentraciones superiores a 1 mM (Omata, 1995) y cuya velocidad aumenta linealmente al aumentar la concentración de nitrato extracelular, lo que sugiere que se trate de difusión; y otro de alta afinidad, mediado por un sistema de transporte activo probablemente dependiente de ATP, como sugiere su sensibilidad a inhibidores de la F₀F₁-ATPasa como el DCCD (Ohmori *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1983a). El valor de la K_S para el nitrato de este sistema de transporte activo se ha estimado entre 1 y 30 μM (Flores *et al.*, 1983a; Meeks *et al.*, 1983; Tischner y Schmidt, 1984; Rodríguez *et al.*, 1992).

Se ha descrito una proteína de 48 kDa de la membrana plasmática de *Synechococcus* sp. PCC 7942 que muestra el mismo patrón de regulación (ver más adelante) que el sistema de asimilación de nitrato (Madueño *et al.*, 1988b). Su mutación afecta al transporte de nitrato por dicha cianobacteria cuando este sustrato se encuentra

en el medio externo a concentraciones inferiores a 100 μM (Omata *et al.*, 1989). Una proteína similar se ha descrito también en *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Sivak *et al.*, 1989).

Se ha clonado el gen *nrtA* que determina la proteína de 48 kDa del sistema de transporte de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Omata, 1991). Recientemente también se han clonado los genes *nrtA* de *Plectonema boryanum* (Suzuki *et al.*, 1995b) y *Phormidium laminosum* (Merchán *et al.*, 1995a). En los tres casos, el gen *nrtA* está precedido por el gen *nir* (que determina la nitrito reductasa) y al menos en el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942, es seguido por tres genes, *nrtBCD*, cuyos productos son homólogos a proteínas de sistemas de transporte tipo "ABC" (Omata *et al.*, 1993). NrtA, aunque unida a membrana, se considera la proteína periplásmica de unión a nitrato del sistema. NrtB es homóloga a proteínas de membrana de sistemas de transporte "ABC" como ProW, la proteína integral de membrana de la permeasa de glicina-betaína de *E. coli*. NrtD presenta dominios de unión a ATP y es homólogo al "conserved component" de sistemas de transporte tipo "ABC". NrtC es una proteína con dos dominios, el N-terminal es homólogo a NrtD (58% de identidades) y el C-terminal es homólogo a NrtA (30% de identidades). Se ha sugerido que el complejo de membrana del sistema transportador de nitrato estaría constituido por dos moléculas de NrtB, que formarían el poro transmembrana, una molécula de NrtD (ATPasa) y otra de NrtC (ATPasa) (Omata, 1995). Se considera que los genes *nrtABCD* cifran el sistema transportador de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 porque forman parte de un agrupamiento de genes implicados en la asimilación de nitrato y nitrito (entre *nir* y *narB*, ver apdo. 1.3.4; Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993) y porque la mutación de estos genes impide el crecimiento a expensas de concentraciones de nitrato inferiores a 1 mM y el transporte de bajas concentraciones de nitrato (Omata *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994b).

El nitrito entra en la célula cianobacteriana de dos formas diferentes: (1) transporte activo, sensible a DCCD, de alta afinidad (K_s , 6-22 μM ; Flores *et al.*, 1987; Madueño *et al.*, 1987) y (2) difusión como ácido nitroso, cuya contribución al transporte neto de nitrito disminuye al incrementarse el pH del medio (Flores *et al.*, 1987; Martín-Nieto *et al.*, 1989).

El transporte activo de nitrato y el transporte activo de nitrito son mediados por el mismo sistema transportador en *Synechococcus* sp. PCC 7942, ya que nitrato y nitrito compiten por el transportador (Madueño *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992) y los mutantes insecionales del gen *nrtD* están afectados en el transporte activo no sólo de nitrato sino también de nitrito (Luque *et al.*, 1994b).

1.3.2. La nitrato reductasa

La nitrato reductasa cataliza la reducción del nitrato intracelular a nitrito, reacción que requiere dos electrones por molécula de nitrato reducida cedidos, en las cianobacterias, por la ferredoxina (Manzano *et al.*, 1976; Méndez *et al.*, 1981; Arizmendi y Serra, 1990) o, en condiciones de deficiencia de hierro, por la flavodoxina (Manzano, 1977). La nitrato reductasa está constituida por un único polipéptido de 75 a 85 kDa (Candau, 1979; Mikami e Ida, 1984; Martín-Nieto *et al.*, 1992; Rubio *et al.*, 1996b), posiblemente asociado a membranas tilacoidales (Manzano *et al.*, 1976; Ortega *et al.*, 1976), que contiene Mo (Candau, 1979; Mikami e Ida, 1984; Martín-Nieto *et al.*, 1990), S lábil y Fe no hemínico (Candau, 1979; Mikami e Ida, 1984). En el caso de la nitrato reductasa de *Plectonema boryanum* se ha descrito la presencia de dos grupos [2Fe-2S] (Mikami e Ida, 1984). La K_m para el nitrato es de 0,7-2,1 mM, muy superior a la K_s que muestra el sistema transportador para el mismo sustrato (ver más arriba). La reducción de nitrato a nitrito en cianobacterias es un proceso eminentemente fotosintético, encontrándose *in vivo* la producción de 0,5 moles de oxígeno asociada a la reducción de un mol de nitrato a nitrito (Flores *et al.*, 1983a).

En *Synechococcus* sp. PCC 7942 se han aislado mutantes carentes de actividad nitrato reductasa (Kuhlemeier *et al.*, 1984a, 1984b; Madueño *et al.*, 1988a; Vega-Palas *et al.*, 1990; Luque *et al.*, 1992) y se han clonado tres genes o loci relacionados con la reducción de nitrato, *narA*, *narB* y *narC* (Kuhlemeier *et al.*, 1984a, 1984b). El locus *narA* está, realmente, constituido por un agrupamiento de genes implicados en la biosíntesis del cofactor de molibdeno (Rubio *et al.*, 1996a). El gen *narB* es el estructural de la nitrato reductasa (Andriesse *et al.*, 1990; Rubio *et al.*, 1996b). La proteína NarB de *Synechococcus* sp. PCC 7942 muestra un 36,5% de residuos idénticos con la proteína NasA de *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 1993, 1994) que está implicada en la reducción asimilatoria de nitrato en esta bacteria. Ambas proteínas forman parte de una familia de oxidorreductasas bacterianas que contienen como grupo prostético el dinucleótido de guanina y molibdopterina. Nada se sabe acerca de la función del gen o locus *narC*.

1.3.3. La nitrito reductasa

La nitrito reductasa cianobacteriana está constituida por un único polipéptido de 52-68 kDa (Méndez y Vega, 1981; Arizmendi y Serra, 1990; Miyaji y Tamura, 1992) que media la reducción asimilatoria del nitrito hasta amonio, reacción que requiere seis electrones por molécula de nitrito reducida cedidos por la ferredoxina o la flavodoxina (Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977), siendo la K_m para el nitrito de 70-100 μ M (Hattori y Uesugi, 1968; Manzano, 1977; Méndez *et al.*, 1981). En base a estudios

espectrofotométricos del enzima, se dedujo que éste podría contener como grupo prostético un grupo sirohemo. (Méndez y Vega, 1981; Arizmendi y Serra, 1990; Miyaji y Tamura, 1992).

Se ha clonado el gen *nir*, que cifra la nitrito reductasa, de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1993), *Plectonema boryanum* (Suzuki *et al.*, 1995b) y *Phormidium laminosum* (Merchán *et al.*, 1995b). El gen *nir* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 determina una proteína con un 50-54% de residuos idénticos a nitrito reductasas de plantas superiores, siendo además homóloga al componente hemínico de la sulfito reductasa de enterobacterias (Luque *et al.*, 1993). En función de esta similitud y de la conservación de aminoácidos clave del sitio activo se ha propuesto para la nitrito reductasa cianobacteriana un centro activo constituido por un grupo [4Fe-4S] y una molécula de sirohemo (Luque *et al.*, 1993) con una estructura similar a la descrita para el componente hemínico de la sulfito reductasa de enterobacterias (Ostrowski *et al.*, 1989). El gen *nir* de *Plectonema boryanum* determinaría una proteína de 75 kDa con una porción N-terminal homóloga a otras nitrito reductasas y una porción C-terminal que es un 30-35% idéntica a ferredoxinas [2Fe-2S] de plantas superiores y otras cianobacterias (Suzuki *et al.*, 1995b).

1.3.4. Estructura genética del sistema de asimilación de nitrato

En *Synechococcus* sp. PCC 7942 se han descrito dos operones relacionados con la asimilación de nitrato, el operón *nir-nrtABCD-narB* (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993), que se transcribe desde un promotor regulado por la proteína NtcA situado delante del gen *nir* (Luque *et al.*, 1994a), y el operón *nirB-ntcB* (Suzuki *et al.*, 1995a), que lo haría desde un promotor situado delante del gen *nirB*, igualmente regulado por NtcA. Ambos operones son contiguos en el genoma de la estirpe PCC 7942, pero se transcriben divergentemente (Suzuki *et al.*, 1995a). Mientras que el producto del gen *nirB* parece potenciar la actividad de la nitrito reductasa, el producto del gen *ntcB*, que muestra cierta similitud con proteínas reguladoras de la familia LysR, no tiene una función definida. En *Phormidium laminosum* y en *Plectonema boryanum* se han descrito los agrupamientos de genes *nir-nrtABC* y *nir-nrtA*, respectivamente, relacionados con la asimilación de nitrato (Merchán *et al.*, 1995a; Suzuki *et al.*, 1995b).

1.4. ASIMILACIÓN DE AMONIO EN CIANOBACTERIAS

Además de generar amonio intracelularmente a partir de fuentes de nitrógeno como el nitrato o el dinitrógeno, las cianobacterias son generalmente capaces de incorporar al interior celular y asimilar el amonio presente en el medio externo.

1.4.1. Transporte de amonio

El amonio en su forma básica (NH_3) entra en la célula mediante difusión, pero, en su forma ácida (NH_4^+), lo hace mediante un sistema de transporte activo de alta afinidad (K_s para la metilamina, el sustrato habitualmente utilizado en el laboratorio, 7 μM) dependiente de potencial de membrana (Boussiba *et al.*, 1984; Rai *et al.*, 1984). Este sistema de transporte se reprime por altas concentraciones de amonio (Boussiba *et al.*, 1987; Vega-Palas *et al.*, 1990).

1.4.2. Incorporación del amonio a esqueletos carbonados: la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa

El amonio procedente bien de la reducción del nitrato o el nitrito o de la fijación del dinitrógeno, así como el procedente del medio extracelular, se incorpora a esqueletos carbonados en las cianobacterias mayoritariamente mediante el ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). La GS cataliza la amidación del glutamato para formar glutamina, con gasto de ATP, y la GOGAT transfiere el grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato, con aporte de poder reductor, formándose dos moléculas de glutamato. Como resultado del ciclo, por cada mol de amonio asimilado se produce un mol de glutamato. Mientras que la actividad GS celular varía dependiendo de la fuente de nitrógeno disponible en el medio de cultivo (Meeks *et al.*, 1977; Vega-Palas *et al.*, 1990), la actividad GOGAT muestra poca variación.

La GS de cianobacterias puede suponer el 0,5-2% de la proteína total de la célula y está constituida por 12 subunidades idénticas agrupadas en dos anillos hexagonales superpuestos (Sampaio *et al.*, 1979; Orr *et al.*, 1981; Mérida *et al.*, 1990), mostrando así una estructura similar a la de otras GS procariotas. La K_m de la GS para el amonio varía entre 20 y 65 μM (Orr y Haselkorn, 1981; Florencio y Ramos, 1985; Mérida *et al.*, 1990). El gen *glnA*, que determina la glutamina sintetasa, se clonó a partir de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante hibridación heteróloga usando como sonda el gen *glnA* de *E. coli* (Fisher *et al.*, 1981); posteriormente se han clonado otros genes *glnA* cianobacterianos, bien mediante hibridación con el de *Anabaena* sp. PCC 7120 o por complementación de mutantes de *E. coli* auxótrofos para Gln (Elmorjani *et al.*, 1992; Mérida *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1993). Como se discutirá más adelante, el gen *glnA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se expresa desde diferentes promotores, unos constitutivos, otros regulados en función de la fuente de nitrógeno disponible (Tumer *et al.*, 1983). En *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Synechococcus* sp. PCC 7002 también se han descrito varios promotores para el gen *glnA* (Wagner *et al.*, 1993; Liotenberg 1995).

Se han obtenido mutantes del gen *glnA* de algunas cianobacterias (Wagner *et al.*, 1993; Reyes y Florencio, 1994), lo que indica que la proteína GlnA no es esencial en



las mismas y que debe existir otra GS cifrada por otro gen. Así, mediante complementación de mutantes de *E. coli*, se ha clonado el gen *glnN* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, el cual determina una GS homóloga a la encontrada en la familia *Bacteriodaceae* (Reyes y Florencio, 1994). El gen *glnN* parece expresarse a niveles apreciables sólo en ausencia de nitrógeno combinado. Hasta la fecha no se ha logrado el aislamiento de dobles mutantes afectados simultáneamente en *glnA* y *glnN* (Reyes y Florencio, 1994). El gen *glnN* no se ha encontrado en las cianobacterias formadoras de heterocistos.

En cuanto a la GOGAT, es una flavoproteína constituida por un único polipéptido que contiene como grupo prostético FMN y usa ferredoxina como donador de electrones (Marqués *et al.*, 1992). Recientemente se han clonado dos genes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que determinan glutamato sintasas homólogas de 170-180 kDa (Navarro *et al.*, 1994), que podrían incluir como grupo prostético un centro sulfoférrico del tipo [3Fe-4S], además del grupo FMN (Navarro, 1996). Sólo uno de estos genes, *gltS*, se encuentra en cianobacterias formadoras de heterocistos (Navarro, 1996).

1.5. REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN CIANOBACTERIAS

1.5.1. Regulación de la fijación de dinitrógeno

La fijación de dinitrógeno es un proceso costoso tanto desde el punto de vista del ATP como del poder reductor; como consecuencia de ello, las cianobacterias, al igual que otros organismos diazotróficos, exhiben una clara preferencia por la asimilación de fuentes de nitrógeno combinado como el amonio, el nitrato o el nitrito (Stewart y Rowell, 1975; Flores y Herrero, 1994).

El efecto negativo del amonio sobre la fijación de dinitrógeno opera en *Anabaena* sp. PCC 7120 a distintos niveles. Así, el amonio (1) impide el desarrollo de heterocistos, no observándose expresión, u observándose una expresión muy baja, de algunos genes implicados en el desarrollo del heterocisto (como *hetR*; Buikema y Haselkorn, 1991); (2) inhibe la síntesis de la nitrogenasa (Stewart y Rowell, 1975; Ramos *et al.*, 1985) reprimiendo la expresión de los genes *nifHDK* (Rice *et al.*, 1982) y (3) a alto pH provoca una modificación postraducciona reversible de la dinitrogenasa reductasa que lleva asociada una inhibición de la actividad de fijación de dinitrógeno (Reich *et al.*, 1986). El nitrato, por su parte, inhibe el desarrollo de los heterocistos y reprime la expresión del operón *nifHDK*, requiriéndose para ello su reducción hasta amonio (Martín-Nieto *et al.*, 1991). La represión por amonio de la fijación del dinitrógeno requiere que el amonio, bien procedente del medio externo o de la

reducción del nitrato, sea asimilado vía GS-GOGAT (Stewart y Rowell, 1975; Ramos y Guerrero, 1983; Ramos *et al.*, 1985).

1.5.2. Regulación de la asimilación de nitrato y nitrito

El amonio ejerce un efecto negativo sobre la asimilación de nitrato y nitrito a dos niveles. Por una parte, inhibe las actividades de transporte activo de nitrato (Ohmori *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1980) y nitrito (Flores *et al.*, 1987). De nuevo se requiere que el amonio sea metabolizado vía GS-GOGAT para ejercer su inhibición (Flores *et al.*, 1980). Cabe destacar que el transporte de nitrato y nitrito requiere que tenga lugar la fijación de CO₂, de forma que en ausencia de CO₂ o tras inhibición de su fijación ambas actividades de transporte resultan inhibidas (Flores *et al.*, 1983b; Romero *et al.*, 1985). Se ha postulado que algunos productos de la fijación de CO₂ (efectores positivos) podrían combinarse con algunos productos de la asimilación de amonio (efectores negativos), eliminando de esta manera su efecto inhibitorio (Flores *et al.*, 1983b). Por otra parte, el amonio inhibe la síntesis de proteínas implicadas en la asimilación de nitrato, como la proteína de 48 kDa de la membrana plasmática (Madueño *et al.*, 1988b; Omata, 1995), la nitrato reductasa (Stevens y van Baalen, 1974; Herrero *et al.*, 1981, 1985; Martín-Nieto *et al.*, 1989), la nitrito reductasa (Méndez *et al.*, 1981; Herrero y Guerrero, 1986; Martín-Nieto *et al.*, 1989) y la glutamina sintetasa (Mérida *et al.*, 1990; Vega-Palas *et al.*, 1990). El efecto inhibitorio del amonio tiene lugar a nivel de transcripción (Stevens y van Baalen, 1974; Herrero *et al.*, 1981) afectándose la expresión del operón *nir* (Suzuki *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994a) y del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983; Luque *et al.*, 1994a). Dicha represión requiere la metabolización del amonio vía GS-GOGAT (Herrero *et al.*, 1981, 1985; Herrero y Guerrero, 1986; Mérida *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1993).

En cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno la ausencia de amonio del medio externo es suficiente para alcanzar altos niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa (Herrero *et al.*, 1981, 1985; Herrero y Guerrero, 1986; Martín-Nieto *et al.*, 1989); sin embargo, en cianobacterias fijadoras, como *Anabaena* sp. PCC 7120, además de la ausencia de amonio se requiere la presencia de nitrato o nitrito para alcanzar altos niveles de dichas actividades (Herrero *et al.*, 1981, 1985; Herrero y Guerrero, 1986; Martín-Nieto *et al.*, 1989). En este último caso el efecto negativo del amonio no se debe a un fenómeno de "exclusión del inductor", por inhibición del transporte de nitrato y nitrito, sino a un verdadero efecto negativo del amonio sobre la expresión de dichas proteínas (Martín-Nieto *et al.*, 1989).

1.5.3. La proteína P_{II}

El sistema Ntr media la regulación de la expresión de genes implicados en la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno en un amplio número de eubacterias (Reitzer y Magasanik, 1987). Una de las proteínas clave de dicho sistema es la proteína P_{II}, cifrada por el gen *glnB*. Esta proteína, que actúa como un trímero, se presenta en enterobacterias en estado uridililado o no uridililado en función de la disponibilidad de diversas fuentes de nitrógeno e, indirectamente, regula tanto la actividad de la GS como del sistema Ntr (Reitzer y Magasanik, 1987). Se ha clonado el gen *glnB* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tsironemas *et al.*, 1991) que determina una proteína que actúa como trímero y que se fosforila en un residuo de Ser en función del estado nitrogenado celular y de la actividad de fijación de CO₂ (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994). En presencia de amonio o de bajas concentraciones de CO₂, la proteína P_{II} se halla totalmente desfosforilada, mientras que se distinguen distintos grados de fosforilación con una, dos o tres subunidades fosforiladas en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado y según la disponibilidad de CO₂ (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994, 1995a). La actividad quinasa que fosforila a la proteína P_{II} parece ser estimulada por α -cetoglutarato, actuando el ATP como donador del grupo fosfato (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1995b). Recientemente se ha puesto de manifiesto que la proteína P_{II} está implicada en la regulación por amonio de la actividad del sistema de transporte activo de nitrato y nitrito en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tandeau de Marsac *et al.*, 1995).

1.5.4. La proteína NtcA

En *Synechococcus* sp. PCC 7942 se han descrito mutantes que presentan un fenotipo pleiotrópico consistente en la falta de expresión, en ausencia de amonio, de proteínas o actividades reprimibles por amonio, tales como nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa y las actividades de transporte de nitrato y metilamina (Vega-Palas *et al.*, 1990). Mediante complementación de uno de dichos mutantes se clonó el gen *ntcA*, que determina un regulador positivo de la expresión de actividades reprimibles por amonio en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Vega-Palas *et al.*, 1990). La expresión del gen *ntcA* está sujeta a autorregulación y, por tanto, también se encuentra regulada por amonio (Luque *et al.*, 1994a).

La proteína NtcA es homóloga a las de una familia de reguladores bacterianos de la transcripción, de la que Crp es uno de los representantes más estudiados (Vega-Palas *et al.*, 1992). Al igual que éstos, la proteína NtcA presenta en su extremo C-terminal un dominio hélice-giro-hélice de unión al DNA (Vega-Palas *et al.*, 1992). De hecho, Luque *et al.* (1994a) han demostrado que NtcA se une a secuencias que se

localizan delante de genes a los que regula, como los genes *nir*, *glnA* y el propio *ntcA*, y han descrito que la secuencia de DNA característica de los sitios a los que NtcA se une es GTAN₈TAC.

En cianobacterias, se han descritos varios promotores de expresión constitutiva que son reconocidos por la RNA polimerasa "vegetativa" cianobacteriana. Ésta presenta en *Anabaena* sp. PCC 7120 una estructura similar a la RNA polimerasa de otros procariotas, como *E. coli*, con la excepción de contener una subunidad adicional denominada γ . Así, la estructura del holoenzima quedaría como $\beta'\beta\gamma\alpha_2\sigma$ (Schneider *et al.*, 1987). La subunidad σ "vegetativa" es cifrada por el gen *sigA* y es homóloga al factor σ^{70} de *E. coli* y al factor σ^{43} de *Bacillus subtilis* (Brahamsha y Haselkorn, 1991). Como consecuencia de lo anterior la RNA polimerasa "vegetativa" es capaz de reconocer promotores cuyas secuencias características, así como el espaciamiento entre las mismas, se aproximan a aquéllas de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa de *E. coli* con el factor σ^{70} (Schneider *et al.*, 1991; Elhai, 1993; Floriano *et al.*, 1994). La secuencia consenso del promotor reconocido por la RNA polimerasa- σ^{70} de *E. coli* es: TTGACAN₁₅₋₂₁TATAAT (Record *et al.*, 1996), donde el primer hexámero es el conocido como región -35 y el segundo como región -10.

Los promotores de los genes de *Synechococcus* sp. PCC 7942 regulados por NtcA tienen una región -10 reconocible, caracterizada por la secuencia TAN₃T, pero no así una región -35 (Luque *et al.*, 1994a). La secuencia GTAN₈TAC de unión de NtcA se sitúa, aproximadamente, en la posición ocupada por la región -35 de los promotores tipo consenso de *E. coli*. La estructura del promotor regulado por NtcA sería: GTAN₈TACN₂₂₋₂₃TAN₃TN₄₋₆(+1). En los casos de los genes *nir*, *glnA* y *ntcA* de *Synechococcus* sp. PCC 7942, NtcA actuaría en ausencia de amonio como un regulador transcripcional positivo de la expresión de estos genes (Luque *et al.*, 1994a).

Los objetivos de este trabajo fueron, por una parte, la caracterización del sistema de asimilación de nitrato de *Anabaena* sp. PCC 7120 y, por otra, el estudio del papel del gen regulador *ntcA* en la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno en dicha cianobacteria.

Parte de los resultados que se exponen en esta memoria han sido ya publicados:

Frías J.E., Mérida A., Herrero A., Martín-Nieto J. y Flores E. (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 5710-5713.

Frías J.E., Flores E. y Herrero A. (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 14: 823-832.

Frías J.E., Flores E. y Herrero A. (1996) Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. (Enviado)

Simultáneamente a la realización del trabajo que se presenta, se ha descrito la existencia en *Anabaena* sp. PCC 7120 de un factor de unión al DNA con capacidad de unión a las regiones promotoras de los genes *xisA*, *nifH*, *glnA* y *rbcL* (secuencia consenso a la que se une: GTGN₉₋₁₀CAC), que ha resultado corresponder a la proteína NtcA (Wei *et al.*, 1993, 1994).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cianobacterias

En este trabajo se ha utilizado la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 (ATCC 27893) como organismo modelo para el estudio de aspectos relacionados con la regulación génica y procesos de desarrollo en cianobacterias. Esta cianobacteria pertenece a la Sección IV de Rippka *et al.* (1979), integrada por organismos que forman filamentos lineales con capacidad de diferenciar heterocistos para la fijación del dinitrógeno. Además de *Anabaena* sp. PCC 7120, otras cianobacterias utilizadas fueron: las cianobacterias unicelulares pertenecientes a la Sección I *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ATCC 27184) y PCC 6308 (ATCC 27150) y *Synechococcus* sp. PCC 7202 (ATCC 29140), la cianobacteria filamentosa no formadora de heterocistos perteneciente a la Sección III *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (ATCC 27190) y las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos de la Sección IV *Anabaena variabilis* PCC 7937 (ATCC 29413), *Anabaena* sp. PCC 6411 (ATCC 27898), *Calothrix* sp. PCC 7601, *Nostoc* sp. PCC 6719 (ATCC 29105) y PCC 7422 (ATCC 29132) y de la Sección V *Fischerella muscicola* UTEX 1829.

El medio utilizado para el cultivo de cianobacterias era el BG110, descrito por Rippka *et al.* (1979), cuya composición es: Na₂CO₃, 0,2 mM; MgSO₄, 0,3 mM; CaCl₂, 0,24 mM; K₂HPO₄, 0,2 mM; ácido cítrico, 28,5 μM; citrato férrico amónico (17% Fe), 6 mg·l⁻¹; Na₂-EDTA, 2,4 μM; H₃BO₃, 46 μM; MnCl₂, 9,1 μM; Na₂MoO₄, 1,6 μM; ZnSO₄, 0,8 μM; CuSO₄, 0,3 μM y CoCl₂, 0,2 μM. El medio se preparaba a partir de un concentrado 100x que carecía del K₂HPO₄ y de la fuente de nitrógeno, los cuales se añadían antes de esterilizar en el autoclave. La fuente de nitrógeno podía ser NaNO₃ a concentración final 17,6 mM (medio BG11) o NH₄Cl a concentración final 2,5 mM tamponado con TES-NaOH (5 mM; pH 7,5) (medio BG110A). Para preparar este último medio se utilizaba una disolución concentrada de NH₄Cl/TES-NaOH (pH 7,5) que se esterilizaba por filtración y se añadía al medio BG110 tras esterilización de este último en autoclave.

Para cultivo líquido, las cianobacterias se disponían en matraces erlenmeyers, de 100 ml (50 ml de medio de cultivo) o 250 ml (100 ml de medio de cultivo) de capacidad, que se incubaban en agitadores orbitales, situados en una cámara termostatzada a 30°C, con agitación continua (90 rpm) e iluminación superior con luz blanca (75 μE·m⁻²·s⁻¹); o bien en tubos de 70 ml (40 ml de medio de cultivo) o en frascos de 240 ml (150 ml de medio de cultivo) de capacidad. En estos dos últimos casos los cultivos se burbujeaban con aire estéril para permitir una correcta aireación y agitación de los mismos. Cuando se requerían antibióticos en el medio de cultivo las

concentraciones de los mismos eran: neomicina (Nm), $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; estreptomycin (Sm), $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; espectinomycin (Sp), $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y eritromicina $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para cultivo en medio sólido se utilizaba Bacto-Agar Difco a concentración final 1% p/v. Éste se autoclavaba por separado de los nutrientes y se mezclaba con los mismos antes de verterlo en las cajas Petri. Las concentraciones de antibióticos utilizadas en medio sólido eran: neomicina (Nm), $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; estreptomycin (Sm), 2 ó $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; espectinomycin (Sp), 2 ó $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y eritromicina (Em), $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.1.1.1. Recogida y lavado de células

La recogida de células se llevaba a cabo alternativamente por centrifugación o por filtración. La recogida por centrifugación se realizaba, según el volumen de cultivo, en una centrífuga Heraeus Megafuge 1.0 ($2500 \times g$, 5 min) o en centrífuga Sorvall utilizando rotores SS34 ($8000 \times g$, 5 min) o GSA ($4000 \times g$, 10 min). La recogida de células por filtración se llevaba a cabo utilizando filtros Millipore tipo HA ($0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro).

Cuando, por razones experimentales (experimentos de inducción), se requería transferir las células a medios suplementados con una fuente de nitrógeno diferente de la utilizada para su cultivo, las células se recogían por centrifugación o filtración, se lavaban 2-3 veces con medio fresco carente de fuente de nitrógeno, y se resuspendían en los nuevos medios a la concentración celular deseada.

2.1.1.2. Curvas de crecimiento

En los experimentos dirigidos a estimar la tasa de crecimiento de una determinada estirpe cianobacteriana, los cultivos, en erlenmeyers de 100 ml, se inoculaban a una densidad celular inicial de $0,2 \mu\text{g}$ de clorofila· ml^{-1} a partir de cultivos líquidos en medio BG110A (suplementado, en su caso, con antibióticos). Las células utilizadas para la inoculación previamente se habían lavado exhaustivamente, mediante centrifugación en condiciones axénicas, con medio fresco carente de fuente de nitrógeno. Posteriormente, se tomaban muestras del cultivo a distintos tiempos de incubación en condiciones de cultivo para medir la concentración de proteína del mismo. La tasa de crecimiento correspondía a la pendiente de la recta obtenida al representar el $\ln(X_t/X_0)$ frente al tiempo (en horas), siendo X_t la concentración de proteína de la muestra tomada a tiempo t , y X_0 la de la muestra tomada a tiempo cero.

2.1.2. Estirpes de *Escherichia coli*

Las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo junto con sus características genotípicas más destacadas se describen en la Tabla 1.

Las diversas estirpes se cultivaban normalmente en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), salvo para la preparación de células competentes, para lo que se usaba el medio Ψ (Sambrook *et al.*, 1989).

Las concentraciones de antibióticos que se usaban, en caso necesario, eran: ampicilina (Ap), 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; kanamicina (Km), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; cloranfenicol (Cm), 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; estreptomycin (Sm), 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y espectinomicina (Sp), 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para el cultivo de *E. coli* en medio líquido se usaban tubos de 10 ml de capacidad conteniendo 3 ml de medio o tubos de 40 ml conteniendo 5 ó 10 ml de medio, que se incubaban en agitadores orbitales a 37°C.

Para el cultivo en medio sólido se utilizaba el medio LB (Sambrook *et al.*, 1989) solidificado con Bacto-Agar Difco al 1,5% (p/v). Las concentraciones de antibióticos utilizadas eran las mismas que para el medio líquido.

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

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	F- <i>supE44 hsdR17 (rK-mK-)recA1 girA96 endA1 thi-1 relA1</i> <i>Δ(lacZYA-argF) (Δ80lacZΔM15)U169</i>	Hanahan (1983)
HB101	F- <i>hsdS20(rB-mB-) leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2</i> <i>rpsL20 xyl-5 ml-1 recA13 mcrB</i>	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
ED8654	F- <i>lac-3 o lacY1 galK2 galT22 supE44 supF58 mcrA1 recA56</i> <i>met B1 hsdR514 (rK-mK+) trpR55</i>	Murray <i>et al.</i> (1977)
MC1061	F- <i>araD139 Δ(ara-leu)7696 Δ(lac)X74 galU galK hsdR2</i> <i>(rK-mK+) mcrB1 rpsL</i>	Wertman <i>et al.</i> (1986)

2.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DE CONSUMO DE NITRATO

2.2.1. Actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa se determinaba usando metil-viológeno reducido con ditionito como donador de electrones (Manzano *et al.*, 1976), básicamente como se describe en Herrero *et al.* (1981), y midiendo la cantidad de nitrito producido en el ensayo como resultado de la reducción del nitrato. Las determinaciones se realizaban *in situ* en células permeabilizadas con el detergente MTA (MTA-5, Sigma). Las células,

recogidas por centrifugación, se lavaban dos veces con BG110 y se resuspendían en el mismo medio a razón de 10-20 μg de clorofila· ml^{-1} . La mezcla de ensayo contenía, en 1 ml, además de la cantidad de células correspondiente a 5 μg de clorofila: tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, 100 mM (pH 10,5); KNO_3 , 100 mM; metil-viológeno, 4 mM; MTA, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 10 mM. La reacción se iniciaba por adición del ditionito, preparado inmediatamente antes de su uso a concentración 100 mM en NaHCO_3 0,3 M. La mezcla de reacción resultante se incubaba a 30°C durante 5 min, transcurridos los cuales la reacción se detenía oxidando rápidamente el ditionito mediante agitación vigorosa hasta la desaparición del color azul del metil-viológeno reducido. Los restos celulares se precipitaban por adición de 0,1 ml de NaOH 1 M y 0,1 ml de ZnSO_4 1 M, agitación y centrifugación a 2500 x g durante 5 min (Herrero *et al.*, 1984). La determinación del nitrito producido se realizaba a partir de 0,5 ml del sobrenadante obtenido.

La concentración inicial de nitrito en la mezcla de reacción se determinaba en ensayos control en los que la suspensión celular se añadía a la mezcla de reacción tras la oxidación del ditionito.

El nitrito se determinaba mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). Las muestras a analizar (0,5 ml) se suplementaban con agua hasta 1 ml, añadiéndose a continuación 1 ml de disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 N y 1 ml de disolución de N-NEDA al 0,02% (p/v) en agua. Tras agitar inmediatamente la mezcla resultante, ésta se incubaba 10 min a temperatura ambiente y, a continuación, se determinaba la absorbancia a 540 nm del complejo coloreado formado. El coeficiente de extinción empleado era $E = 55 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Una unidad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de nitrito por min.

2.2.2. Actividad nitrito reductasa

La actividad nitrito reductasa se determinaba *in situ* en células permeabilizadas con MTA utilizando metil-viológeno como donador de electrones (Manzano *et al.*, 1976), básicamente como se describe en Herrero y Guerrero (1986), y midiendo la desaparición del nitrito como consecuencia de su reducción hasta amonio. Para la determinación de la actividad nitrito reductasa, las células se resuspendían en BG110, tras ser recogidas del cultivo y lavadas con BG110, a razón de 80-100 μg de clorofila· ml^{-1} . La mezcla de ensayo contenía en 1 ml de volumen total, además de la cantidad de células correspondientes a 35-40 μg de clorofila: tampón MOPS-NaOH, 25 mM (pH 7,2); KNO_2 , 0,5 mM; metil-viológeno, 5 mM; MTA, 185 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 20 mM. La reacción se iniciaba por adición del ditionito, preparado inmediatamente antes de su uso a concentración 200 mM en NaHCO_3 0,3 M. La mezcla de reacción se

incubaba a 30°C durante 10 min, deteniéndose la reacción mediante agitación vigorosa hasta la oxidación total del ditionito. Los restos celulares se precipitaban mediante la adición de 0,1 ml de NaOH 1 M y 0,1 ml de ZnSO₄ 1 M, agitación y centrifugación, determinándose a continuación el nitrito presente en 0,1 ml del sobrenadante obtenido. Para determinar el nitrito presente inicialmente en la mezcla de reacción se usaban ensayos control realizados tal y como se detalla en el apartado anterior .

La concentración de nitrito se determinaba por el método descrito en el apartado anterior. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de nitrito por min.

2.2.3. Actividad glutamina sintetasa

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinaba *in situ* en células permeabilizadas con MTA, mediante una adaptación del método descrito por Dobrogosz (1981). Además de una cantidad de células equivalente a 5 μg de clorofila, la mezcla de reacción, cuyo volumen final era de 1 ml, contenía: tampón HEPES-NaOH, 50 mM (pH 7,0); L-glutamina, 20 mM; hidroxilamina-HCl, 18 mM; NaOH, 18 mM; MnCl₂, 0,27 mM; ADP-Na₂, 0,36 mM; Na₂HAsO₄, 25 mM y MTA, 187,5 μg·ml⁻¹. La reacción se iniciaba por adición del arseniato y se desarrollaba durante 10 min a 30°C, tras los cuales se paraba por adición de 2 ml de una disolución de FeCl₃ en medio ácido, la cual servía además para determinar la cantidad de γ-glutamihidroxamato producido en la reacción (Shapiro y Stadman, 1970). La concentración inicial de hidroxamatos en la mezcla de reacción se determinaba en ensayos control en los que el arseniato se sustituía por agua.

La disolución de FeCl₃ contenía: HCl, 0,28% (p/v); ácido tricloroacético, 1,2% (p/v) y FeCl₃·6 H₂O, 0,12 M.

Tras adición de la disolución de FeCl₃, la mezcla resultante se centrifugaba a 2500 x g durante 5 min y se medía la absorbancia a 500 nm en el sobrenadante obtenido. La concentración del complejo coloreado formado se determinaba usando un coeficiente de extinción $E = 0,89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de γ-glutamihidroxamato por min.

2.2.4. Actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa se determinaba *in vivo*, en condiciones aeróbicas, según la técnica de reducción de acetileno (Stewart *et al.*, 1967). Para ello se disponían cultivos líquidos en erlenmeyers de 100 ml de capacidad con 50 ml de cultivo conteniendo 1 μg de clorofila·ml⁻¹ en medio BG110. Tras 24 ó 48 horas de cultivo, se

recogían por centrifugación las células de alícuotas de 10 ml, las cuales se resuspendían en 2 ml del mismo medio y se disponían en erlenmeyers de 17 ml de capacidad. Éstos se cerraban con tapones de goma, inyectándose 2 ml de acetileno de alta pureza hasta conseguir una atmósfera del 10% (v/v) de acetileno en aire. Las suspensiones celulares resultantes se incubaban en condiciones de cultivo durante 1 hora, determinándose entonces el etileno producido, utilizando para ello una muestra de 1 ml de fase gaseosa.

El etileno se determinaba mediante cromatografía, utilizándose un cromatógrafo de gases PYE Unicam 204 equipado con un inyector, una columna Porapak Q y un detector de ionización de llama, mantenidos a 100, 80 y 150°C, respectivamente. Las presiones parciales de los gases usados durante la cromatografía eran de 2, 0,4 y 0,4 kg·cm⁻² para el H₂, el aire y el N₂, respectivamente. La señal de salida era procesada por un integrador PYE Unicam DP88, el cual proporcionaba el área de cada pico detectado por el cromatógrafo. Éste se calibraba con cantidades conocidas de etileno.

2.2.5. Determinación del consumo de nitrato

Básicamente se realizaba como se describe en Flores *et al.* (1983a). Las células se lavaban por filtración con tampón Tricina-NaOH 10 mM (pH 8,1) y se resuspendían a razón de 10 µg de clorofila·ml⁻¹ en 15 ml del mismo tampón. Las suspensiones celulares se colocaban a 30°C con agitación continua en erlenmeyers (de 100 ml) abiertos al aire y los ensayos se iniciaban encendiendo la luz (100 µE·m⁻²·s⁻¹) tras la adición del sustrato (NaNO₃, 0,1 mM, concentración final). A diferentes tiempos se tomaban alícuotas de 2 ml de la suspensión celular, que se filtraban inmediatamente a través de filtros Millipore tipo HA (0,45 µm de diámetro de poro). Finalmente, se determinaba la concentración de nitrato presente en el filtrado obtenido.

El nitrato se determinaba según el método descrito por Cawse (1967). Un volumen de 0,75 ml de filtrado de la suspensión celular se suplementaba con 0,05 ml de ácido amido-sulfúrico al 10% (p/v) (para eliminar el nitrito que pudiera existir en la mezcla) y, tras agitar vigorosamente, con 0,2 ml de ácido perclórico al 20% (v/v). La concentración de nitrato se estimaba en base a su absorbancia a 210 nm, utilizando un coeficiente de extinción $E = 7,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Alternativamente, la actividad de consumo de nitrato se determinaba como cuantificación del amonio, resultado de la reducción intracelular del nitrato, que en células tratadas con MSX se libera al medio externo (Flores *et al.*, 1983a). Al igual que con el método anterior, las células, tras haber sido lavadas por filtración con tampón Tricina-NaOH 10 mM (pH 8,1), se resuspendían a razón de 10 µg de clorofila·ml⁻¹ en 10 ml del mismo tampón. Dichas suspensiones celulares se colocaban en erlenmeyers de 50 ml de capacidad que se incubaban en un baño termostático a 30°C con agitación continua a la luz (100 µE·m⁻²·s⁻¹) y con MSX (L-metionina-D-L-

sulfoximina) 1 mM durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadía el sustrato (NaNO_3) a concentración final de 17,6 mM. A determinados tiempos se tomaban alícuotas de 2 ml de la suspensión celular que se filtraban inmediatamente a través de filtros Millipore tipo HA (0,45 μm de diámetro de poro). Finalmente se determinaba la concentración de amonio presente en el filtrado.

El amonio se determinaba enzimáticamente midiendo la oxidación del NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, utilizándose el amonio como sustrato limitante (Bergmeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris/Tricina 100 mM (pH 8,1); α -cetoglutarato, 10 mM; ADP- Na_2 , 1,2 mM; NADPH, 0,2 mM y una alícuota de la muestra. La reacción se iniciaba por adición de 10 μl de glutamato deshidrogenasa (1,2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, Boehringer) y se desarrollaba durante aproximadamente 10-15 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción, antes y después de desarrollarse ésta, se determinaba según su absorbancia a 340 nm, utilizándose un coeficiente de extinción $E = 6,2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Los valores obtenidos se corregían con los correspondientes a reacciones control a las que no se añadía muestra con amonio.

2.3. MÉTODOS GENÉTICOS

2.3.1. Conjugación *E. coli*-*Anabaena* sp.

La transferencia de material genético a *Anabaena* sp. desde *E. coli* se realizaba mediante conjugación (Wolk *et al.*, 1984), tal y como se describe en Elhai y Wolk (1988b), método en el cual se aprovecha la capacidad de plásmidos conjugativos de amplio espectro como RP4 y sus derivados (por ejemplo, pRL443; Elhai y Wolk, 1988b) de movilizar a otros plásmidos presentes en la misma célula. Los plásmidos a transferir se protegían frente a las endonucleasas de restricción presentes en la cianobacteria receptora (*Ava*I, *Ava*II y *Ava*III en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120) utilizando metilasas localizadas en los plásmidos pRL528 (para metilar sitios *Ava* I y *Ava*II) (Elhai y Wolk, 1988b) y pRL591-W45 (para metilar sitios *Ava*III) (Elhai *et al.*, 1994). Por otra parte, para la selección de estirpes que hubieran incorporado el DNA exógeno mediante doble recombinación con el propio genomio, se hacía uso de vectores incapaces de replicarse en *Anabaena* sp. y portadores del gen *sacB*, que provocaba sensibilidad a sacarosa (Cai and Wolk, 1990).

La conjugación se realizaba según el siguiente procedimiento: alícuotas de 0,25 ml de cultivos de *E. coli* ED8654 (pRL443) y *E. coli* HB101 (X, pRL528, pRL591-W45, siendo X el plásmido a transferir a *Anabaena* sp., se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados. Los

cultivos resultantes se incubaban durante 2,5 h a 37°C con agitación. Transcurrido este tiempo, las células se recogían por centrifugación y se lavaban con 10 y 5 ml de LB en pasos sucesivos, mezclándose entonces las dos suspensiones celulares, que se sedimentaban conjuntamente. El sedimento obtenido se resuspendía en 0,2-0,3 ml de medio LB y se incubaba a temperatura ambiente durante 1,5-2 h. Tras este tiempo la suspensión se mezclaba con una cantidad de células de *Anabaena* sp. correspondiente a 10 µg de clorofila, procedentes de un cultivo líquido, y la mezcla se extendía sobre filtros de nitrocelulosa (Nucleopore REC-85) en cajas de Petri con medio de cultivo permisivo suplementado con LB al 5% (v/v). Las cajas se incubaban 4-5 h a baja intensidad de luz y posteriormente se pasaban a condiciones normales de cultivo. Tras 24 h en dichas condiciones, los filtros se pasaban a cajas con medio permisivo sin LB, en las que se incubaban otras 24 h, pasadas las cuales los filtros se cambiaban a cajas con medio selectivo. Las colonias resistentes aparecían en el último medio tras 10-15 días de incubación. En aquellos casos donde se transfería un vector portador del gen *sacB*, se preparaban cultivos líquidos de varios de los exconjugantes obtenidos, los cuales se sometían a sonicación (en un baño sonicador) hasta obtener una longitud media de los filamentos de 3-4 células. Posteriormente, se recogían estos filamentos por centrifugación y se sembraban en medio selectivo suplementado con sacarosa al 5% (p/v). Aproximadamente tras 10 días de incubación en condiciones de cultivo aparecían colonias resistentes a la sacarosa. Para comprobar si realmente eran dobles recombinantes, varias de estas colonias se transferían a medio selectivo suplementado o no con el antibiótico frente al cual el vector *sacB* usado confería resistencia. Las colonias que eran sensibles a este antibiótico se consideraban dobles recombinantes. Generalmente, entre el 95 y el 99% de los clones analizados resultaban ser dobles recombinantes.

2.3.2. Transformación de *Escherichia coli*

Las células de *E. coli* no son transformables de forma natural, por lo que hay que someterlas a un tratamiento para que adquieran tal capacidad. El procedimiento seguido para ello fue el descrito por Hanahan (1983). Se inoculaban matraces de 500 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio Ψ, con 0,25 ml de cultivo en el mismo medio. Estos matraces se incubaban a 37°C con agitación durante 2-3 h hasta que el cultivo alcanzaba una $A_{550\text{nm}}$ de 0,48-0,50. En este momento, el matraz se pasaba a una mezcla de agua y hielo, donde se mantenía durante 10 min para enfriar el cultivo y parar su crecimiento. Se centrifugaba (4000 x g, 5 min, 4°C) y las células sedimentadas se resuspendían en 30 ml de disolución TjBI (RbCl, 100 mM; MnCl₂, 50 mM; acetato potásico, 30 mM; CaCl₂, 10 mM y glicerol, 15% (v/v); pH 5,8 ajustado con ácido acético) fría. La suspensión resultante se centrifugaba de nuevo de la misma forma y las

células se resuspendían en 4 ml de disolución TjBII (tampón MOPS, 10 mM; RbCl, 10 mM; CaCl₂, 25 mM y glicerol, 15%, (v/v); pH 7,0 ajustado con NaOH) fría. Ambas disoluciones se esterilizaban por filtración usando filtros Nalgene (0,2 µm de diámetro de poro).

La suspensión celular se distribuía en alícuotas de 0,1 ml que se conservaban a -80°C. La frecuencia de transformación obtenida con células de las estirpes de *E. coli* DH5α y HB101 era normalmente de 10⁶ a 10⁷ transformantes·µg⁻¹ de DNA.

Para llevar a cabo la transformación, se mezclaban 0,1 ml de suspensión de células transformables, previamente descongeladas en hielo, con DNA transformante (en un volumen máximo de 10 µl). La mezcla se incubaba en hielo durante 15 min y se sometía a un choque térmico a 42°C durante 100 s. Después se incubaba 6 min a temperatura ambiente, se suplementaba con 1 ml de medio LB, y la suspensión celular resultante se incubaba 1 h con agitación a 37°C. Por último, las células se sembraban en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados.

En aquellos casos en los que se pretendía seleccionar transformantes utilizando el ensayo de "complementación α" (Sambrook *et al.*, 1989), las cajas de medio LB con antibiótico (normalmente unos 25 ml de cultivo) se suplementaban con 4 µl de IPTG al 2% (p/v) y 40 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-tiogalactopiranosido (X-Gal) al 20% (p/v).

2.4. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA

2.4.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Se utilizaron dos métodos de aislamiento diferentes:

(1) Método de "lisis alcalina" (Birnboim y Doly, 1979). Las células de 3 ml de cultivo se recogían por centrifugación (15000 x g, 5 min) y el sedimento resultante se resuspendía en 100 µl de disolución I (Tris-HCl, 25 mM, pH 8; glucosa, 50 mM; EDTA, 10 mM, pH 8). Tras esto, se añadían 200 µl de disolución II (NaOH, 0,2 N; SDS al 1% p/v) y se agitaba brevemente, provocándose la lisis celular. Se añadían entonces 150 µl de disolución III (acetato potásico 5 M, pH 4,8), se agitaba suavemente, se incubaban las muestras en hielo durante 5 min y se centrifugaba (15000 x g, 7 min a 4°C). El sobrenadante obtenido se sometía a una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), separándose las fases mediante centrifugación (15000 x g, 3 min) y la fase acuosa se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se resuspendía en 25-50 µl de TE (Tris-HCl, 10 mM; EDTA, 1 mM, pH 8).

(2) Procedimiento de "hervido" (Holmes y Quidley, 1981). Las células de 3 ml de cultivo se recogían por centrifugación (15000 x g, 3 min) y se resuspendían en 350

µl de STET (sacarosa, 8%; Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0; EDTA, 50 mM, pH 8, y Tritón X-100, 0,5% v/v). La mezcla resultante se suplementaba con 25 µl de lisozima (10 mg·ml⁻¹ en Tris-HCl 1 M, pH 8), se agitaba suavemente y se incubaba en agua hirviendo durante 40 segundos. Posteriormente se centrifugaba a 4°C y 15000 x g durante 20 min. El precipitado gelatinoso formado se eliminaba con un palillo autoclavado y los ácidos nucleicos presentes en la disolución se precipitaban con 350 µl de isopropanol, incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaba durante 15 min (15000 x g, temperatura ambiente) y el precipitado obtenido se dejaba secar durante otros 15 min en una corriente de aire y se resuspendía en 25-30 µl de TE.

2.4.2. Aislamiento de DNA total de *Anabaena* sp.

El aislamiento de DNA total de *Anabaena* sp. se realizaba tal y como se describe en Cai y Wolk (1990). Las células de un cultivo de 50 ml se recogían por centrifugación a 4000 x g durante 5-10 min y se resuspendían en 400 µl de TE_{1/10} (Tris-HCl, 10 mM, pH 8; EDTA, 0,1 mM, pH 8). A esta suspensión celular se añadían 150 µl de perlas de vidrio (0,2-0,3 µm de diámetro, producto G-9143 de Sigma), 20 µl de SDS al 10% (p/v) y 450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Esta mezcla se sometía a 4 ciclos de agitación con vórtex (1 min)/incubación en hielo (1 min), tras los cuales se centrifugaba (12000 x g, 15 min, 4°C) y el sobrenadante obtenido se sometía a extracciones sucesivas una vez con fenol, otra con fenol:cloroformo y dos veces con cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaban con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto, normalmente mediante incubación a -20°C durante 14-15 h. Posteriormente se centrifugaba (12000 x g, 20 min, 4°C) y el precipitado se lavaba con etanol al 70%. Los ácidos nucleicos se resuspendían en 30-50 µl de TE.

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

Se utilizó como molde DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120, obtenido según se describe en el apdo. 2.4.2. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40 µl, conteniendo Tris-HCl, 10 mM, pH 8,3; MgCl₂, 1,5 mM; KCl, 50 mM; gelatina, 0,1 mg·ml⁻¹; 0,2 mM de cada dNTP; 50 pmol de cada oligonucleótido; 2 ng de DNA molde y 2,5 U de Tap DNA polimerasa (Boehringer). A esta mezcla se añadieron 25 µl de aceite mineral para evitar la evaporación. La amplificación se realizó en un aparato Mastercycler 5330 (Eppendorf) y consistió en un primer ciclo de 2 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C; 1 min de renaturalización a 50°C y 3 min de polimerización a 72°C y, por último, un ciclo a 72°C durante 10 min.

El resultado de la PCR se analizó según se describe en el apdo. 2.4.4.

2.4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles de agarosa se preparaban en tampón TBE (Tris-borato, 90 mM; EDTA, 2 mM, pH 8,0). La concentración de agarosa de los geles variaba entre el 0,6% y el 1,5% dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos que se deseaba resolver. Antes de someterlas a electroforesis, las muestras se suplementaban con tampón de carga compuesto por glicerol al 7,2%, EDTA 20 mM (pH 8,0), azul de bromofenol al 0,08% y xileno-cianol FF al 0,08%. Como patrones de tamaño se utilizaban los fragmentos de DNA resultantes de la digestión del DNA del fago lambda con *HindIII* o con *ClaI*. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales marca Pharmacia modelos GNA-100 o GNA-200. Para la detección del DNA, se añadía a los geles de agarosa bromuro de etidio a una concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El DNA se visualizaba iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta LKB™ modelo 2011 Macro Vue y se fotografiaba utilizando un equipo Polaroid™ modelo MP4 o una videocámara ImageStore 5000 (UVP).

2.4.5. Extracción de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis se extraían siguiendo uno de los siguientes procedimientos. (1) Mediante el uso del juego de reactivos "GeneClean II" (BIO 101 Inc., USA), procedimiento que se basa en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI 6 M y la unión del DNA a perlas de vidrio. (2) Mediante congelación del trozo de agarosa a -20°C en el interior de una jeringa y extracción de la fase líquida por presión. Esta fase se sometía después a extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v), tras lo cual el DNA se precipitaba con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70% y, tras dejar secar, se resuspendía en 10-15 μl de TE. (3) Mediante el uso de agarosa de bajo punto de fusión NuSieve®GTG®, la cual permite, tras su fusión, la ligación de fragmentos de DNA sin necesidad de extraerlos de la agarosa.

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

El DNA, una vez sometido a electroforesis en geles de agarosa, se transfería a membranas de nylon GeneScreen Plus™ (Dupont), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, el gel se sumergía en HCl 0,25 M durante unos 10 min (este tratamiento provoca la pérdida de bases púricas del DNA y la consecuente rotura del mismo lo que facilita su transferencia a través del gel de agarosa), tras los cuales el gel se lavaba abundantemente con agua y el DNA contenido en él se transfería por capilaridad a una membrana usando NaOH 0,4 M como vehículo de transferencia (el NaOH provoca la desnaturalización del DNA necesaria para la hibridación posterior). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se dejaba secar a temperatura ambiente.

Para la hibridación, la membrana se sumergía en SSPE 2x durante 1-2 min y, posteriormente, en una disolución conteniendo: SSPE 5x; disolución de Denhardt 5x; SDS 0,5% (p/v) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado a 100°C durante 10 min, 50 µg·ml⁻¹ (para hibridaciones heterólogas) o 100 µg·ml⁻¹ (para hibridaciones homólogas). La disolución de SSPE se preparaba concentrada 20x (NaCl, 3,6 M; fosfato sódico, 0,2 M, pH 8,3, y EDTA, 0,02 M) y la disolución de Denhardt 100x (ficol, 2% p/v; polivinilpirrolidona soluble, 2% p/v y seroalbúmina bovina Fracción V, 2% p/v). La membrana se incubaba, sumergida en esta disolución, a 55°C (para hibridaciones heterólogas) o 65°C (para hibridaciones homólogas) durante al menos una hora, añadiéndose después la sonda radiactiva previamente desnaturalizada mediante incubación a 100°C durante 10 min. Tras incubar durante 14-16 h en dichas condiciones, la membrana se lavaba por inmersión en las siguientes disoluciones de forma secuencial:

- (1) SSPE 2x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación, durante 10 min (2 veces),
 - (2) SSPE 1x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación, durante 10 min (2 veces) y
 - (3) SSPE 0,5x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación, durante 10 min (una vez).
- Los resultados se visualizaban mediante autorradiografía o mediante análisis con un InstantImager (un detector bidimensional de partículas β de la marca Packard).

2.4.7. Secuenciación de DNA

El DNA a utilizar como molde se desnaturalizaba mediante tratamiento con NaOH 0,4 M durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se cromatografiaba a través de una columna de Sephadex G-50, con el fin de eliminar el NaOH y posibles impurezas, y el DNA recuperado se mantenía a 0-4°C.

Las reacciones de secuenciación se realizaban según el método descrito por Sanger *et al.* (1977), basado en la terminación de la elongación de cadenas de DNA por incorporación de didesoxirribonucleótidos. Para llevar a cabo las reacciones se utilizaba el juego de reactivos suministrado por Pharmacia bajo la denominación de "T7

Sequencing Kit", y se seguían las instrucciones del fabricante. Se realizaba una reacción de elongación de la cadena de DNA a partir de un cebador, dividiéndose la mezcla de reacción posteriormente en cuatro partes iguales que se procesaban separadamente, añadiéndose a cada una de ellas uno de los cuatro didesoxirribonucleótidos. El marcaje radiactivo de las cadenas se realizaba con [α - 35 S]dATP (1212 mCi·mmol⁻¹, Amersham). Los cebadores utilizados eran los denominados "universal -20" y "reverso" (Boehringer Mannheim), que hibridan con los vectores utilizados, pBluescriptSK(+), pIC20R o pGEM7z f(+), en zonas adyacentes al inserto que se deseaba secuenciar.

Los fragmentos de DNA generados durante las reacciones de secuenciación se resolvían mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles se preparaban al 6% de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) y 8 M de urea en tampón TBE (apartado 2.4.4) y se polimerizaban con persulfato amónico al 0.08% (p/v) y TEMED 6 mM, que actuaba de catalizador de la polimerización. Los cristales que servían de soporte al gel se impregnaban, previamente a la preparación del éste, con una disolución repelente de silano de diclorodimetilo (Merck) y se dejaban secar al menos durante 20 min a temperatura ambiente, lo cual facilitaba la separación del gel de los cristales, una vez concluida la electroforesis. La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos modelo SE 1500 (Hofer Scientific Instruments) a una potencia de 130 W. Una vez finalizada la electroforesis el gel se transfería a papel Whatman 3MM y se secaba al vacío, a 80°C, en un secador de geles modelo SE1160 (Hofer Scientific Instruments). Los fragmentos de DNA se visualizaban mediante autorradiografía con películas Valca HPX-44 o Kodak X-OMAT.

2.5. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA

2.5.1. Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción empleadas se adquirían a Boehringer Mannheim o a Pharmacia, y se utilizaban según las recomendaciones del fabricante. Se siguieron dos normas generales: que el tampón recomendado supusiese el 10% del volumen final de la mezcla de reacción y que el volumen de enzima utilizado no superase nunca el 10% del volumen final de la mezcla de reacción. En el caso de restricciones dobles o triples se usaba aquel tampón con el que todos los enzimas tuviesen la máxima actividad posible. Si no había una opción adecuada, se utilizaba el tampón único recomendado por Pharmacia. El tiempo de restricción (de 3 a 20 h) dependía de la naturaleza del DNA (cromosómico o plasmídico) y de las cantidades de DNA enzima utilizadas.

2.5.2. Desfosforilación

Con el fin de evitar la religación del vector en aquellos casos en los que se intentaba clonar un fragmento de DNA no seleccionable, los grupos fosfato de los extremos 5' del vector se eliminaban mediante desfosforilación usando para ello la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Pharmacia), según las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989). Tras la reacción, el DNA se sometía a electroforesis en geles de agarosa y se extraía como se describe en el apartado 2.4.5.

2.5.3. Relleno de extremos 5' protuberantes.

Con el fin de hacer romos extremos 5' protuberantes de algunos plásmidos digeridos con endonucleasas de restricción, éstos se trataban con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia). Para ello, a 16 μ l de mezcla de restricción, previamente calentada a 65°C durante 15 min para inactivar la endonucleasa, se añadía 1 μ l de enzima Klenow (2 U· μ l⁻¹), 2 μ l de tampón Klenow 10x (Tris-HCl, 0,5 M, pH 7,5; MgCl₂, 0,1 M y DTT, 0,1 M) y 1 μ l de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos a concentración 1 mM de cada uno de ellos. La mezcla se incubaba durante 30 min a 37°C, tras lo cual se sometía a electroforesis en geles de agarosa, extrayéndose el fragmento correspondiente al vector (apartado 2.4.5).

2.5.4. Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de DNA se realizaba mezclando los fragmentos de interés en presencia de 1-3 U de ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim, Pharmacia o Promega) y del tampón suministrado por la casa comercial. La mezcla resultante se incubaba durante 8-16 h a 12-16°C. En aquellos casos en que se utilizaban fragmentos de DNA embebidos en agarosa de bajo punto de fusión (apdo. 2.4.5), la ligación de los fragmentos de DNA se realizaba como sigue: se fundían los trozos de agarosa (contenidos en tubos Eppendorf) mediante incubación a 65°C durante 10 min y, tras incubarlos a 37°C (para evitar la solidificación de la agarosa) durante otros 10 min, se utilizaban alícuotas de las disoluciones resultantes para preparar una mezcla de ligación similar a la descrita anteriormente. La concentración de agarosa en la mezcla final de ligación nunca debía superar el 1,5% (p/v).

2.5.5. Marcaje radiactivo de sondas de DNA

El marcaje radiactivo de sondas de DNA se realizaba mediante el método de cebadores aleatorios, usando para ello el juego de reactivos denominado "Random

Primed DNA Labelling Kit" (Boehringer Mannheim) o "Ready To Go" (Pharmacia), siguiendo en cada caso las recomendaciones del fabricante. Los nucleótidos no incorporados se eliminaban filtrando la muestra a través de una columna de Sephadex G-50. En caso del marcaje de oligonucleótidos en su extremo 5' se utilizaba el enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (Boehringer Mannheim); para ello, se preparaba una mezcla de reacción que se incubaba 1 h a 37°C y que contenía: oligonucleótido, 100-200 ng; Tris-HCl, 50 mM (pH 7,5); MgCl₂, 10 mM; seroalbúmina bovina, 50 µg·ml⁻¹; espermidina, 0,1 mM; DTT, 10 mM; [γ -³²P]dATP, 50 µCi, y polinucleótido quinasa, 2-3 U·µl⁻¹ (Boehringer). Los nucleótidos no incorporados tras este marcaje se eliminaban mediante precipitación con etanol absoluto y acetato sódico y lavados sucesivos con etanol al 70% (v/v).

2.6. GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE SUBGENOTECAS

2.6.1. Generación de subgenotecas

En todos aquellos casos en los que se pretendía la clonación de un fragmento de tamaño definido identificado mediante hibridación con una sonda determinada, se procedía de la siguiente forma:

- a) Digestión del DNA genómico con la endonucleasa de restricción adecuada y electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos de DNA generados.
- b) Extracción de los fragmentos de DNA del tamaño adecuado del gel de agarosa. Normalmente se extraía el DNA de varios bloques de agarosa contiguos en el gel, cada uno de los cuales se manipulaba individualmente.
- c) Electroforesis de una alícuota del DNA extraído de cada uno de los bloques de agarosa anteriores. El resto del DNA se guardaba a -20°C.
- d) Transferencia a filtro de nylon e hibridación con la sonda adecuada para la identificación de la fracción que contenía el fragmento de DNA a clonar.
- e) Ligación de los fragmentos contenidos en la fracción que mostraba hibridación con el vector adecuado y transformación de *E. coli* HB101.
- f) Inoculación de clones individuales.

2.6.2. Análisis de subgenotecas

Las subgenotecas se analizaban bien mediante hibridación de clones individuales (hibridación en colonias; ver más adelante) o bien mediante análisis de Southern (apdo. 2.4.6) de preparaciones de plásmidos de mezclas de clones.

Para el análisis individual, los filtros de nitrocelulosa (Nucleopore, REC-85) conteniendo réplicas de 50 clones de *E. coli* se ponían en contacto, sucesivamente, con hojas de papel Whatman 3MM empapadas en cuatro disoluciones diferentes con el fin de fijar el DNA al filtro: (1) SDS al 10% (p/v), 3 min; (2) NaOH, 0,5 M y NaCl, 1,5 M (disolución desnaturalizante), 5 min; (3) NaCl, 1,5 M y Tris-HCl, 0,5 M, pH 8 (disolución neutralizante), 5 min y (4) SSC 2x (disolución equilibrante), 5 min. La disolución de SSC se preparaba concentrada 20x (NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M). A continuación los filtros se dejaban secar durante 30 min a temperatura ambiente sobre papel de filtro y, posteriormente, se incubaban durante 1 h a 80°C.

Con el fin de eliminar los restos celulares que interferirían en la hibridación posterior, antes de ser sometidos a hibridación, los filtros se trataban de la siguiente forma: se sumergían en SSC 2x durante 5 min, tras los cuales se lavaban, durante 30 min a 50°C con agitación, en una disolución conteniendo SSC 5x, SDS al 0,5% (p/v) y EDTA 1 mM (pH 8). A continuación los filtros se frotaban con papel Boxell hasta eliminar gran parte de los restos celulares presentes en las réplicas.

Para llevar a cabo la hibridación, los filtros se sumergían en una disolución conteniendo: fosfato potásico 25 mM, pH 7,4; SSC 5x; disolución de Denhardt 5x; DNA de esperma de arenque desnaturalizado a 100°C durante 10 min, 50 µg·ml⁻¹ (para hibridaciones heterólogas) o 100 µg·ml⁻¹ (para hibridaciones homólogas), y SDS al 1% (p/v). Los filtros se incubaban, sumergidos en esta disolución, a 55°C (para hibridaciones heterólogas) o 65°C (para hibridaciones homólogas) durante al menos una hora, y después se añadía la sonda radiactiva (apartado 2.5.5) previamente desnaturalizada a 100°C durante 10 min. Los filtros se mantenían durante 14-16 h en las mismas condiciones usadas para la prehibridación, procediéndose después a realizar una serie de lavados de los mismos con el fin de eliminar los restos de sonda radiactiva que no hubieran hibridado. Las condiciones de los lavados eran:

- (1) SSC 2x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación, durante 10 min (2 veces),
- (2) SSC 0,5x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación durante 10 min (2 veces),
- (3) SSC 0,1x + 0,1% SDS, a la temperatura de hibridación durante 10 min (2 veces) y
- (4) SSC 0,1x + 0,5% SDS, a la temperatura de hibridación durante 10 min (una vez).

Los resultados se visualizaban mediante autorradiografía o mediante análisis en un InstantImager.

2.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA

2.7.1. Aislamiento de RNA total

Para extraer RNA de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 se utilizaron dos procedimientos :

(1) El descrito por Ausubel *et al.* (1994) para bacterias Gram-negativas. Una suspensión celular creciendo activamente (conteniendo aproximadamente 500 μg de clorofila en 150 ml de medio) se colocaba en hielo y se suplementaba con 1/20 (en volumen) de tampón Tris-HCl, 200 mM, pH 8; EDTA, 20 mM y azida sódica, 20 mM. Se centrifugaba a 4°C y 5000 x g durante 5 min y el sedimento obtenido se resuspendía en 2 ml de disolución de rotura STET (sacarosa, 8% p/v; Tritón X-100, 5% v/v; EDTA, 50 mM y Tris-HCl, 50 mM, pH 8), añadiéndose a continuación 0,1 ml de una disolución 200 mM del complejo vanadil-ribonucleósido (inhibidor de RNAsas, New England Biolabs), 2 ml de perlas de vidrio (0,45 μm de diámetro, producto G9268 de Sigma) y 1 ml de fenol tamponado a pH 8. La mezcla resultante se sometía a agitación vigorosa durante un minuto, tras lo cual se añadía 1 ml de cloroformo y se agitaba de nuevo durante un minuto. La suspensión obtenida se centrifugaba a 4°C y 10000 x g durante 10 min. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaban con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto mediante incubación durante al menos 30 min a -20°C, se recogían por centrifugación a 4°C y 10000 x g durante 10 min y se resuspendían en 2 ml de disolución 10 mM del complejo vanadil-ribonucleósido. Esta disolución se sometía a dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo (1:1) y los ácidos nucleicos se volvían a precipitar como se ha descrito anteriormente. Tras ser lavados con etanol al 70%, se resuspendían finalmente en 50-100 μl de agua.

(2) El método descrito por Golden *et al.* (1987). Una suspensión celular creciendo activamente (conteniendo 500 μg de clorofila en 150 ml de medio de cultivo) se resuspendía en 5 ml de TE 50/100 (Tris-HCl, 50 mM; EDTA, 100 mM, pH 8) y, tras la adición de 1 ml de cloroformo, se incubaba 5 min en hielo y se centrifugaba a 4°C y 8000 x g durante 10 min. El sobrenadante resultante se eliminaba y el sedimento de células se resuspendía en 5 ml de mezcla de rotura (Tris-HCl, 45 mM, pH 8; EDTA, 90 mM, pH 8; Tritón X-100, 0,45% v/v; sarcosil, 0,45% v/v; SDS, 0,36% p/v y complejo vanadil-ribonucleósido, 12 mM). A continuación se añadían 5 ml de perlas de vidrio (0,45 μm de diámetro, producto G9268 de Sigma) y 5 ml de fenol:cloroformo (1:1). La mezcla se sometía a 3 ciclos de agitación (3 min) e incubación en hielo (3 min) y después se centrifugaba. La fase acuosa obtenida se sometía a cuatro extracciones sucesivas, las dos primeras con fenol:cloroformo (1:1) y las dos últimas con cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaban con dos volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2). El RNA se purificaba entonces mediante centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. Para ello, los ácidos nucleicos se resuspendían en 9 ml de TE, a los que se añadían 4,5 g de CsCl. En un tubo de ultracentrífuga se disponían 3,75 ml de CsCl 5,7 M, preparado en TE, sobre los que se depositaba suavemente la disolución de ácidos nucleicos con CsCl. Tras centrifugar en un rotor Beckman tipo SW28.1 a 25000 rpm durante 16 h a 20°C, el precipitado



conteniendo el RNA se resuspendía en agua, el RNA se volvía a precipitar con etanol y acetato sódico y, tras lavar con etanol al 70%, se resuspendía en agua nuevamente.

En ambos procedimientos el DNA contaminante en las preparaciones finales se eliminaba tratando las muestras con DNasa I libre de RNasas (Boehringer Mannheim).

2.7.2. Ensayos de extensión del cebador

En los ensayos de extensión del cebador se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

5' - TCAAACCAGAATCTGCCAAA - 3'	<i>glnA</i> ;
5' - CGCCGCCGATGTTTCACTGAAGG - 3'	<i>nir-1</i> ;
5' - GAGGCTGGCTTTGGGGG - 3'	<i>nir-2</i> ;
5' - GCGCAGCCTTCCCGCAGGG - 3'	<i>nir-3</i> ;
5' - AGTCTAGCCTTGTTTTACCAACA - 3'	<i>nir-14</i> .

Los oligonucleótidos se marcaban radiactivamente como se describe en el apartado 2.5.5. Una vez marcado el oligonucleótido, se mezclaban aproximadamente 30-40 ng del mismo con 50 µg de RNA total en presencia de KCl, 150 mM; Tris-HCl, 10 mM (pH 8) y EDTA, 1 mM (pH 8). La mezcla resultante se incubaba a 85°C durante 10 min, con el fin de desnaturalizar el RNA, y posteriormente se incubaba a 50°C durante 3 h, para permitir el alineamiento del cebador con el RNA. A continuación se desarrollaba la reacción de extensión del cebador durante 1 h a 42 ó 47°C. La mezcla de reacción de extensión, en un volumen final de 45 µl, contenía: Tris-HCl, 20 mM, pH 8; MgCl₂, 10 mM; DTT, 5,5 mM; actinomicina D, 0,15 µg·µl⁻¹; cada uno de los cuatro dNTP, 3 mM, y transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMV) (Boeriner Mannheim), 0,15 U·µl⁻¹. Una vez concluida la fase de extensión, la mezcla se trataba con RNasa A libre de DNasas (Boeriner Mannheim), tras lo cual se hacía una extracción con fenol:cloroformo (1:1), precipitándose el DNA con acetato sódico y etanol absoluto. El DNA obtenido se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 5-7 µl de tampón conteniendo: formamida, 98% v/v; xylene-cianol, 0,1% p/v; azul de bromofenol, 0,1% p/v y EDTA, 10 mM (Sambrook *et al.*, 1989). Esta preparación se sometía a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% (apartado 2.6.3), paralelamente a una reacción de secuenciación (apartado 2.6.2) en la que se usaba como cebador el mismo oligonucleótido utilizado en la reacción de extensión.

2.7.3. Análisis de "Northern"

El RNA (25-35 µg), antes de ser sometido a electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído, se desnaturalizaba durante 15 min a 55°C en presencia de formaldehído (6,4%), formamida (50% p/v) y tampón de electroforesis conteniendo:

MOPS, 40 mM; acetato sódico, 10 mM y EDTA, 1 mM; pH 7,2. A continuación se añadía a cada muestra 1/5 en volumen de tampón de carga (EDTA, 1 mM, pH 8; azul de bromofenol, 0,25% p/v; xileno-cianol, 0,25% p/v, y glicerol, 50% v/v) y se cargaba en un gel de agarosa al 1,0-1,5% conteniendo formaldehído al 1,1% y tampón de electroforesis que se sometía a electroforesis a $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Tras ello, el gel se lavaba con agua para eliminar parte del formaldehído y se procedía a la transferencia, por capilaridad, del RNA a un filtro de nylon GeneScreen Plus (Dupont) usando SSPE 10x como tampón de transferencia. Posteriormente, el filtro se incubaba en un horno a 80°C durante 2 h para secarlo y eliminar el formaldehído remanente.

Para la hibridación, la membrana se incubaba en disolución de hibridación (SSPE 5x; formamida desionizada, 50% v/v; disolución de Denhardt, 5x; SDS, 1% p/v, y DNA de esperma de arenque, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 42°C , con agitación, entre 2 y 4 h. Posteriormente se añadía la sonda marcada radiactivamente (apartado 2.5.5) que previamente se había desnaturalizado mediante incubación a 100°C durante 5-10 min. La membrana se incubaba en las mismas condiciones de la prehibridación de 14 a 16 h, tras las cuales se procedía a eliminar la sonda que no había hibridado. Para ello se lavaba en las condiciones siguientes:

- (1) SSPE 2x, a temperatura ambiente durante 15 min (2 veces) y
- (2) SSPE 2x + 2% SDS, a 65°C durante 15-30 min (1 vez).

Los resultados se visualizaban mediante autorradiografía o mediante análisis en un InstantImager.

Cuando el oligonucleótido *nir-3* (apartado 2.7.2) se usaba como sonda, la membrana se incubaba en disolución de prehibridación (SSC 6x; disolución de Denhardt 5x; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0,05% p/v; SDS, 0,5% p/v, y DNA de esperma de arenque, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 37°C durante 1 h. Tras esto, la disolución de prehibridación se sustituía por un mismo volumen de disolución de hibridación (SSC 6x; disolución de Denhardt 1x; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0,05% p/v, y tRNA de levadura, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se añadía el oligonucleótido marcado (apartado 2.5.5). Tras 14-16 h a 42°C , el filtro se lavaba de la siguiente forma:

- (1) SSC 6x + $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ al 0,05% (p/v), a temperatura ambiente durante 15 min (3 veces) y
- (2) SSC 6x + $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ al 0,05% (p/v), a 55°C durante 15 min (una vez).

Los resultados se visualizaban mediante autorradiografía o mediante análisis en un InstantImager.

2.7.4. Hibridación usando RNA como sonda

El marcaje del RNA se realizaba básicamente como se describe en Apte y Haselkorn (1990). Así, $15 \mu\text{g}$ de RNA total se hidrolizaban parcialmente en presencia

de NaOH 125 mM durante 40 min a 0-4°C. La disolución se neutralizaba por adición de 0,25 volúmenes de Tris-HCl 1 M, pH 8. El RNA se precipitaba con 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugaba (12000 x g, 20 min, 4°C) y el precipitado se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 11 µl de agua. A esta disolución se añadían: 2 µl de tampón comercial de polinucleótido quinasa 10x (Tris-HCl, 0,5 M; MgCl₂, 100 mM; EDTA, 1 mM; DTT, 50 mM; espermidina, 1 mM; pH 8,2), 5 µl de [γ -³²P]ATP (4500 Ci·mmol⁻¹) y 2 µl de polinucleótido quinasa (10 U·µl⁻¹). La mezcla resultante se incubaba durante 1 h a 37°C, tras lo cual se suplementaba con 2 µl de EDTA 0,5 M (pH 8), para detener la reacción, y se cromatografiaba a través de una columna de Sephadex G-50, equilibrada con agua, para eliminar los nucleótidos no incorporados. Normalmente se obtenía un marcaje de entre 1 x 10⁶ y 2 x 10⁶ cpm·µl⁻¹.

La hibridación se realizaba como se describe en Fellay *et al.* (1995). El filtro (apdo. 2.4.6) se humedecía con SSC 2x durante 2-3 min, tras lo cual se sumergía en disolución de prehibridación (Tris-HCl, 50 mM, pH 8; seroalbúmina bovina, fracción V, 0,2% p/v; ficol, 0,2% p/v; SDS, 1% p/v; Na₄P₂O₇·10 H₂O, 0,1% p/v; NaCl, 1 M, y tRNA, 100 µg·ml⁻¹) y se incubaba durante 3 h a 65°C. Posteriormente se añadía el RNA marcado (como se ha descrito en el apartado anterior) y se incubaba durante 16-17 h a 65°C. Tras esto, el filtro se lavaba para eliminar los restos de RNA marcado que no hubieran hibridado. Las condiciones de lavado eran:

- (1) SSC 1x + 1% SDS, a 65°C durante 30 min (2 veces) y
- (2) SSC 0,2x, a temperatura ambiente durante 15 min (una vez).

Los resultados se visualizaban mediante autorradiografía y se cuantificaban utilizando un InstantImager.

2.7.5. "Slot Blot"

El RNA (15-20 µg) se añadía a 20 µl de una disolución que contenía: formamida desionizada, 50% v/v; formaldehído, 6,4% v/v; MOPS, 20 mM, pH 7,2; acetato sódico 5 mM y EDTA-Na₂, 0,5 mM, pH 7,2. Las mezclas resultantes se calentaban a 95°C durante 3 min y luego se enfriaban en hielo durante al menos 2 min. Tras esto, se suplementaban con 50 µl de agua y 1 µl de una suspensión concentrada de azul de bromofenol y, posteriormente, se cargaban en los pocillos de un aparato de "slot blot" de marca Hoefer siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez secos, los pocillos se lavaban con 0,2 ml de agua. El filtro (GeneScreen Plus) con el RNA se incubaba en un horno a 80°C durante 2 h para fijar el RNA y eliminar el formaldehído remanente, procediéndose a la hibridación igual que en el apdo. 2.7.3.

2.8. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES

2.8.1. Determinación de proteína

La determinación de la cantidad de proteína presente en suspensiones celulares se llevaba a cabo siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones introducidas por Markwel *et al.* (1978). Cantidades variables de muestra se suplementaban con agua hasta un volumen de 0,2 ml y con 50 μ l de NaOH 0,5 N y 750 μ l de una mezcla, en una proporción 100:1, de las disoluciones A y B, cuya composición se especifica a continuación.

Disolución A: Na₂CO₃, 2% p/v; NaOH, 0,4% p/v; tartrato sódico potásico, 0,16% p/v y SDS, 1% p/v.

Disolución B: SO₄Cu·5H₂O, 4% p/v.

Tras incubar 15 min a 30°C se añadían 75 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido (2x) en agua, incubándose de nuevo a 30°C durante 30 min. A continuación se medía la absorbancia a 660 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

2.8.2. Determinación de clorofila

El contenido celular en clorofila *a* se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (MacKinney, 1941). Un volumen de suspensión celular no superior a 0,1 ml se mezclaba con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrífuga y, tras agitación vigorosa, se centrifugaba a 10000 x g durante 1,5 min. La concentración de clorofila en el sobrenadante resultante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un coeficiente de extinción $E = 74,46 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3. RESULTADOS

3.1. GENES DE ASIMILACION DE NITRATO DE *Anabaena* sp. PCC 7120

Anabaena sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosa capaz de asimilar diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, entre ellas el nitrato. En presencia de nitrato y ausencia de amonio esta cianobacteria incrementa los niveles celulares de varias proteínas implicadas en la asimilación del nitrato, tales como la nitrato reductasa y nitrito reductasa (ver Introducción). Para determinar la estructura genética del sistema de asimilación de nitrato en *Anabaena* sp. PCC 7120 y poder estudiar su expresión, se abordó la clonación de genes implicados en este proceso.

3.1.1. Clonación

Se llevaron a cabo experimentos de Southern en los que se usaba DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 digerido con *Xba*I y, como sonda, un fragmento *Sac*I de 1,5 kb (que comprendía la región C-terminal del gen *nir* y la mayor parte del gen *nrtA*) de la región de asimilación de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1992). Se observó una única banda de hibridación que correspondería a un fragmento de DNA de aproximadamente 5,5-6 kb. Para la clonación de dicho fragmento se construyó una subgenoteca insertando en el vector pBluescript SK(+) los fragmentos de restricción *Xba*I de aproximadamente 5,5-6 kb (ver apdo. 2.6). Los clones obtenidos se analizaron individualmente mediante hibridación (ver apdo. 2.6), detectándose cuatro clones positivos que portaban plásmidos que producían un patrón de restricción idéntico. Se eligió uno de ellos, que portaba el plásmido denominado pCSE2, para análisis posteriores. El plásmido pCSE2 presentaba un inserto *Xba*I de aproximadamente 5,7 kb en el que se detectaron, mediante hibridación y secuenciación parcial, secuencias homólogas a los genes *nir*, *nrtA*, *nrtB* y *nrtC* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Fig. 1; Tabla 2). Los genes *nir*, *nrtA* y *nrtB* estaban completos en el inserto de pCSE2; sin embargo, dicho inserto sólo contenía unos 400 pb por delante del gen *nir* y el gen *nrtC*, que se encontraba detrás de *nrtB*, estaba incompleto. Consecuentemente, existía la necesidad de ampliar la región clonada tanto para poder realizar estudios de la zona promotora (posiblemente localizada delante de *nir*) como para disponer de la agrupación de genes de asimilación de nitrato completa. Usando como sonda, en experimentos de Southern, el fragmento *Sca*I-*Xba*I de 1,8 kb incluido en pCSE2 (Fig. 1) se obtuvo hibridación con una banda *Hind*III de 7-8 kb. Se preparó una subgenoteca en pBluescript SK(+) con fragmentos *Hind*III de ese tamaño (ver apdo. 2.6) y se procedió como en el caso anterior. Se obtuvo un clon positivo que portaba un plásmido denominado pCSE5 que presentaba un inserto de alrededor de 7,8 kb que incluía al de pCSE2 (Fig. 1). Se amplió de esta forma la región ya clonada en 1,8 kb por delante de *nir* y aproximadamente 0,4 kb detrás del fragmento de *nrtC* ya clonado. Todos los

intentos posteriores encaminados a ampliar aún más la región clonada fueron infructuosos.

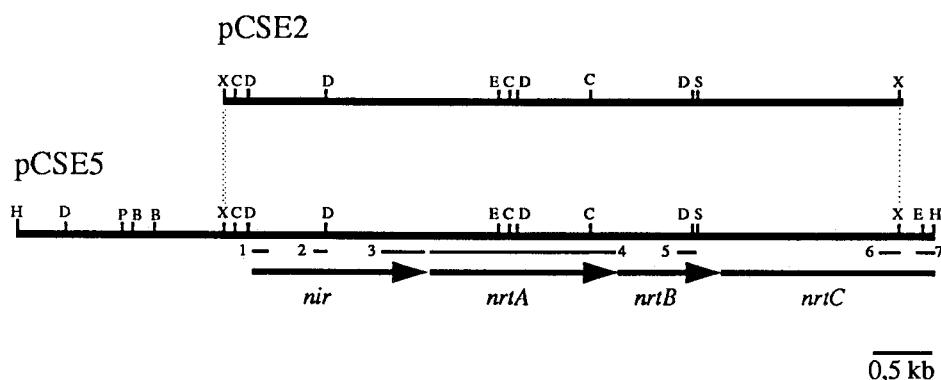


Figura 1. Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSE2 y pCSE5, que contienen parte de la región de asimilación de nitrato de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Los segmentos numerados muestran la posición y longitud de los fragmentos secuenciados que se analizan en la Tabla 1. Las flechas indican cómo se orientan los genes en el fragmento clonado. Abreviaturas: H, *Hind*III; D, *Dra*I; P, *Pvu*II; B, *Bgl*I; X, *Xba*I; C, *Cl*aI; E, *Eco*RV; S, *Sca*I.

Fragmento secuenciado (Nº)	Homología a proteínas de <i>Synechococcus</i> sp.		
	Solapamiento (nº de aminoácidos)	Proteína de <i>Synechococcus</i>	Residuos idénticos (%)
1	31	Nir (1-32)	46,7
2	26	Nir (164-190)	73,0
3	138	Nir (375-512)	65,2
4	440	NrtA (1-440)	57,0
5	51	NrtB (138-188)	64,7
6	62	NrtC (467-528)	48,4
7	59	NrtC (583-642)	42,4

Tabla 2. Identificación de genes de asimilación de nitrato en la región del genomio de *Anabaena* sp. PCC 7120 clonada en pCSE2 y pCSE5.

Las comparaciones de secuencias de aminoácidos se hicieron mediante el uso del programa GAP contenido en el paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984). La numeración mostrada en la primera columna corresponde a la de los fragmentos señalados en la Fig. 1. En la tercera columna se indica, entre paréntesis, con numeración de aminoácidos de la secuencia la proteína de *Synechococcus* sp. PCC 7942 la posición del fragmento polipeptídico al que es homólogo el deducido de *Anabaena* sp. PCC 7120.

AAA GAT GCA CAT TTA GGT AGC TGT GTA CAA AAA GGC ATC CCC TGC GAA GAC TTG CAC CTA GTA	63
lys asp ala his leu gly ser cys val gln lys gly ile pro cys glu asp leu his leu val	
TTA CGA GAC TTA CTC ATT ACT AAT TTT GGA GCC AAA CCC AGA CAG GAA GCC TTA GTT ACC AGC	126
leu arg asp leu leu ile thr asn phe gly ala lys pro arg gln glu ala leu val thr ser	
CAA TAA GGGAGCAGGGGAGAAAACAATTCAAATTCAAAATTCAAAAAAGAGTGGGGTAGTGAGCATGGGGAAGAAAATT	207
gln OCH	
GACTATTGACTGTTGACTAATGACAACACTGACAACACTGACGAATTAACAACATACAAAAA	283
Met thr his val ser arg	
AGA AAA TTT CTT TTC ACC ACA GGC GCG GCG GCG CGG CTT CTA TTT TGG TAC ATG GCT GTA CTT	346
arg lys phe leu phe thr thr gly ala ala ala arg leu leu phe trp tyr met ala val leu	
CCA ATG GTT CTC AAT CAG CTA CCA CAG GAG AAC AAG CGC CTT TCA GCA GCA CCA GCC GCT AAT	409
pro met val leu asn gln leu pro gln glu asn lys arg leu ser ala ala pro ala ala asn	
GTC TCA GCC GCT AAC GCA GGG AAG GTA GAA ACG ACT AAA GCC AAG TTA GGA TTT ATC CCT CTT	472
val ser ala ala asn ala gly lys val glu thr thr lys ala lys leu gly phe ile pro leu	
ACT GAT GCG GCG CCC CTC ATC ATT GCT AAA GAA AAG GGC TTC TTT GCT AAA TAT GGC ATG ACA	535
thr asp ala ala pro leu ile ile ala lys gly phe phe ala lys tyr gly met thr	
<u>EcoRV</u>	
<u>GAT ATC</u> GAA GTC ATC AAG CAA AAA TCT TGC CCT GTC ACC CGC GAT AAC TTA AAA ATT GGC TCA	598
asp ile glu val ile lys gln lys ser cys pro val thr arg asp asn leu lys ile gly ser	
<u>Clal</u>	
TCT GGT GGT GGC <u>ATC GAT</u> GGC GCA CAT ATC CTT AGT CCC ATG CCT TAC CTC ATG ACC ATC AAT	661
ser gly gly gly ile asp gly ala his ile leu ser pro met pro tyr leu met thr ile asn	
GAT AAA GTG CCA ATG TAT ATT TTG GCT AGG TTA AAC ACT AAT GGT CAG GCT ATT TCT GTG GCG	724
asp lys val pro met tyr ile leu ala arg leu asn thr asn gly gln ala ile ser val ala	
GAG AAA TTT AAA GAA CTT AAT GTC AAC CTA GAA AGT AAA TCC CTT AAA GAC GCA GCG ATT AAA	787
glu lys phe lys glu leu asn val asn leu glu ser lys ser leu lys asp ala ala ile lys	
GCC AAA GCT GAC AAG AAA GCC TTG AAA ATG GGT ATT ACC TTT CCC GGT GGT ACA CAC GAT TTG	850
ala lys ala asp lys lys ala leu lys met gly ile thr phe pro gly thr his asp leu	
TGG ATG CGC TAT TGG TTA GCG GCT GGT GGT ATT AAT CCT GAT CAA GAT GTG GTT TTG GAA GCT	913
trp met arg tyr trp leu ala ala gly gly ile asn pro asp gln asp val val leu glu ala	
GTA CCA CCA CCG CAA ATG GTG GCA AAT ATG AAA GTC AAT ACT GTT GAT GGT TTC TGT GTA GGA	976
val pro pro pro gln met val ala asn met lys val asn thr val asp gly phe cys val gly	
GAA CCT TGG AAT GCT CAG TTG GTC AAC CAA AAA ATA GGT TAT TCT GCT CTA GTT ACA GGC GAA	1039
glu pro trp asn ala gln leu val asn gln lys ile gly tyr ser ala leu val thr gly glu	
TTG TGG AAA GAT CAT CCA GAA AAA GCC TTT AGT ATG CGG CAA GAT TGG ATT GAG CAA AAT CCC	1102
leu trp lys asp his pro glu lys ala phe ser met arg gln asp trp ile glu gln asn pro	
AAT GCA GCC CAG GCA ATT TTG ATG GCA ATC TTG GAA GCA CAA CAA TGG TGC GAC AAG GCA GAA	1165
asn ala ala gln ala ile leu met ala ile leu glu ala gln gln trp cys asp lys ala glu	
<u>Clal</u>	
AAC AAA GAA GAA <u>ATG</u> TGT AAA ATC TGC TCT <u>GAT CGT AAA</u> TAC TTT AAT GTT GCT GCC GCA GAT	1228
asn lys glu glu met cys lys ile cys ser asp arg lys tyr phe asn val ala ala ala asp	
ATT ATC GAG AGA GCT AAA GGC AAT ATC GAT TAT GGT GAT GGT CGT AAG GAG CAA AAC TTC GCC	1291
ile ile glu arg ala lys gly asn ile asp tyr gly asp gly arg lys glu gln asn phe ala	
CAT CGG ATG AAA TTC TGG GCA GAT AAT GCT TCC TAT CCT TAT AAG AGT CAC GAT ATT TGG TTT	1354
his arg met lys phe trp ala asp asn ala ser tyr pro tyr lys ser his asp ile trp phe	
TTA ACT GAA GAT ATT CGC TGG GGT TAT TTA CCA AAA GAT ACC AAA GTT CAA GAC ATT GTT AAT	1417
leu thr glu asp ile arg trp gly tyr leu pro lys asp thr lys val gln asp ile val asn	
CAA GTC AAT AAA GAA GAC TTG TGG AAA AAA GCG GCG AAA GCG ATT GGT GTG GCT GAT GCG GAA	1480
gln val asn lys glu asp leu trp lys lys ala ala lys ala ile gly val ala asp ala glu	
ATT CCT GCT AGC AGT TCC CGT GGG GTG GAA ACT TTC TTT GAT GGC GTG AAA TTC GAC CCA GAA	1543
ile pro ala ser ser ser arg gly val glu thr phe phe asp gly val lys phe asp pro glu	
AAG CCA GAA GAA TAC TTA AAT AGT TTG AAA ATC AAA AAA GTC TAA TTG GGC TGT AAT GGC TTC	1606
lys pro glu glu tyr leu asn ser leu lys ile lys lys val OCH	

Figura 2. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 que comprende la región C-terminal del gen *nir* y el gen *nrtA* completo. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida en cada caso.

Se señala la diana *EcoRV* donde se insertó la casete C.K1 (Elhai y Wolk, 1988a) para la generación de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10. También se destacan dos sitios de restricción *Clal* internos del gen *nrtA*. Esta secuencia está depositada en el banco de datos con el número de acceso X99709.


```

NrtA_7120 MTHVSRRKFLFTTGAAARLLFWYMAVLPMLNQLPQENKRLSAAPAANVSAANAGK (56)
NrtA_7942 MSQFSRRKFLLTAGGTAAAALWLNACGSN..NSSTDTTGSTSTPAPSGTSSGGDAPE
NrtA_6803 MGSFNRRKFLLTSAATATGALFLKGCAGNPPDPNAASTGTNPSPQAAGDISPEM.M
NasF MGDKFSISTGDVYYRRGRRWAARCCSPAIMQAAWAAGSDK
. . . . .

NrtA_7120 VETTKAKLGFIPLTDAAPLIIAKEKGFFAKYGMTDIEVIKQKSCPVTRDNLKIGSS (112)
NrtA_7942 VKG..VTLGFIALTDAAPVIIALEKGLFAKYGLPDTKVVKQTSWAVTRDNLLELGS
NrtA_6803 PETANIKLGYIPIVEAAPLIIAQEKGFFAKYGMTGVEVSKQANWASARDNVTIGSQ
NasF PEQTTVRVGFIPLTDCAPLAIASLKGFDKKGITLV.PSKEASWAAVRDKLV....
. . . . . * * * * * . . . . . * * . . . * * * * . .

NrtA_7120 GGGIDGAHILSPMPYLMTI.....NDKVPMYILARLNTNGQAIISVAEKFKELNVN (162)
NrtA_7942 RGGIDGAHILSPMPYLLTAGTITKSQKPLPMYILARLNTQGQGISLSNEFLAEKVQ
NrtA_6803 GGGIDGGQWQMPMPHLITEGIITNGNK.VPMYVLAQLITQNGIIVAPMHEGKGVN
NasF AGELDAAHILYGMLYGLELGI...ASKPQAMANLMTLNRNGQAITLSSELQEQGV.
* * * * * . . . . . . . * * * * * * * * * * *

NrtA_7120 LESKSLKD.AAIKAKADKKALKMGIT.FPGGTHDLWMRYWLAAGGINPDQDVVLEA (216)
NrtA_7942 IKDPKLLA.IADQKKASGKLLKAAVT.FPGGTHDLWMRYWLAANGIDPNNDADLVV
NrtA_6803 LDITKAADYIKGFNKTNGRKFKAHT.FPNVNQDFWIRYWFAAGGVDPDIDLLA
NasF ...TDLSGLEKTRDSARAGQLHLRPTFPPTGTHAMWLYYWLASGGINPFADIRTVV
. . . . . * * * * * . . . . . * * * * * * * * * *

NrtA_7120 VPPPQMVANMKVNTVDGFCVGEWPNAQLVNQKIGYSALVTGELWKDHEKAFSMRQ (272)
NrtA_7942 IPPPQMVANMQTGTMDTFCVGEWPNARLVNKKLGYTAAVTGELWKFHPEKALTIRA
NrtA_6803 VPPAETVQGMNRGTMDAFSTGDPWPYRIVTENIGYMAGLTAQIWPYHPEEYLAIIRA
NasF VPPPQMVMMNRIGNMTAFASASRGTGAIKRSYRFTAATSQDIWPEHPEKILGTRS
* * * * * * * . . . . . * * * * * . . . . . * * * * * . *

NrtA_7120 DWIEQNPNAQAAILMAILEAQWCDKAENKEEMCKICSDRKYFNVAADIIERAKG (328)
NrtA_7942 DWADKNPKATMALLKAVQEAQIWCEDPANLDELQITAQDKYFKTSVEDIKPRLQG
NrtA_6803 DWVDKNPKATKALLKGIMEAQWIDDPKNRPEVVQIVSGRNYFNVPFTILESPFKG
NasF EWTSSQHRARW
* * . . . . . . . . . . . . . . .

NrtA_7120 NIDYGDGRKEQNFAHRMKFW....ADNASYPYKSHDIWFLTEDIRWGY....LPKD (376)
NrtA_7942 DIDYGDGRSVKNSDLRMRFW....SENASFPYKSHDLWFLTEDIRWGY....LPAS
NrtA_6803 QYTMGDGQPAIDDFQKGPLYWKDGI GNVSYPYKSHDLWFLTESIRWGFHKNAIPDL
. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

NrtA_7120 TKVQDIVNQVNKEDLWKAAKAIGVADAEIPASSRGVETFFDGVKFDPEKPEEYL (432)
NrtA_7942 TDTKALIEKVNRSDLWREAAKAIG.REQDIPASDSRGVETFFDGVTFDPENPQAYL
NrtA_6803 DTAQKIIDKVNREDLWREAAATEAGF.TADIPSSTSRGVETFFDGI TFDPANPSAYL
. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

NrtA_7120 NSLKIKKV.. (440)
NrtA_7942 DGLKFKAIKA
NrtA_6803 QSLAIKKV
. .

```

Figura 3. Comparación de la secuencia del producto del gen *nrtA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 con la de las proteínas NrtA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803 y la proteína NasF de *Klebsiella pneumoniae* M5al.

La comparación se llevó a cabo mediante el programa PILEUP contenido en el paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984). Los residuos conservados en 3 ó 4 proteínas se señalan con (*) o (*), respectivamente. La numeración corresponde a la proteína NrtA de *Anabaena* sp.

El gen *nrtA* se secuenció por completo en doble cadena. La secuencia obtenida (Fig. 2) contenía una pauta abierta de lectura (ORF) de 440 aminoácidos, que presentaba un porcentaje de aminoácidos idénticos del 57 y del 48,7% con las proteínas NrtA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Omata 1991) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995), respectivamente, y un 35% con la proteína NasF de *Klebsiella pneumoniae* M5al (Lin *et al.*, 1994) (Fig. 3).

3.1.2. Implicación de la región clonada en la asimilación de nitrato

Con objeto de determinar la implicación de la región genómica clonada en la asimilación del nitrato en *Anabaena* sp. PCC 7120, se procedió a la construcción de un mutante polar de dicha región. El plásmido pCSE21aB, usado para ello, portaba una versión mutada de la región generada por introducción de la casete C.S3 (que proporciona resistencia a estreptomycin y espectinomycin y posee terminadores de transcripción en sus dos extremos; Elhai y Wolk, 1988a; Prentki y Krisch, 1984) entre las dianas *ClaI* exteriores del inserto de pCSE21 (Figs. 4 y 5) con la consiguiente eliminación del gen *nir* y de parte del gen *nrtA*. El plásmido pCSE21aB se transfirió mediante conjugación (ver apdo. 2.3.1) a *Anabaena* sp. EF116, un mutante Fox⁻ (incapaz de fijar dinitrógeno en condiciones aeróbicas) de *Anabaena* sp. PCC 7120. La sucesión de medios utilizada durante la conjugación fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG110A + Sm+Sp. De entre los clones resistentes a Sm y Sp obtenidos se seleccionaron dos que eran también resistentes a sacarosa, que habrían incorporado la construcción mediante doble recombinación, los cuales se sometieron, con el fin de favorecer la segregación de los cromosomas portadores de la mutación, a cultivo líquido, fraccionamiento de los filamentos mediante sonicación y aislamiento de colonias en medio selectivo. A continuación se analizó la capacidad de un grupo de los clones así obtenidos de crecer a expensas de nitrato en presencia de Sm y Sp. Ninguno de los clones analizados era capaz de crecer usando nitrato como fuente de nitrógeno. El análisis de Southern de la estructura genómica de varios de ellos mostró que en todos los casos la versión mutada de la región (fragmento *EcoRV* de 7,6 kb) había sustituido completamente a la versión silvestre de la misma (fragmento *EcoRV* de 3,8 kb). Uno de estos clones se eligió para estudios posteriores, la estirpe CSE1 (Fig. 5).

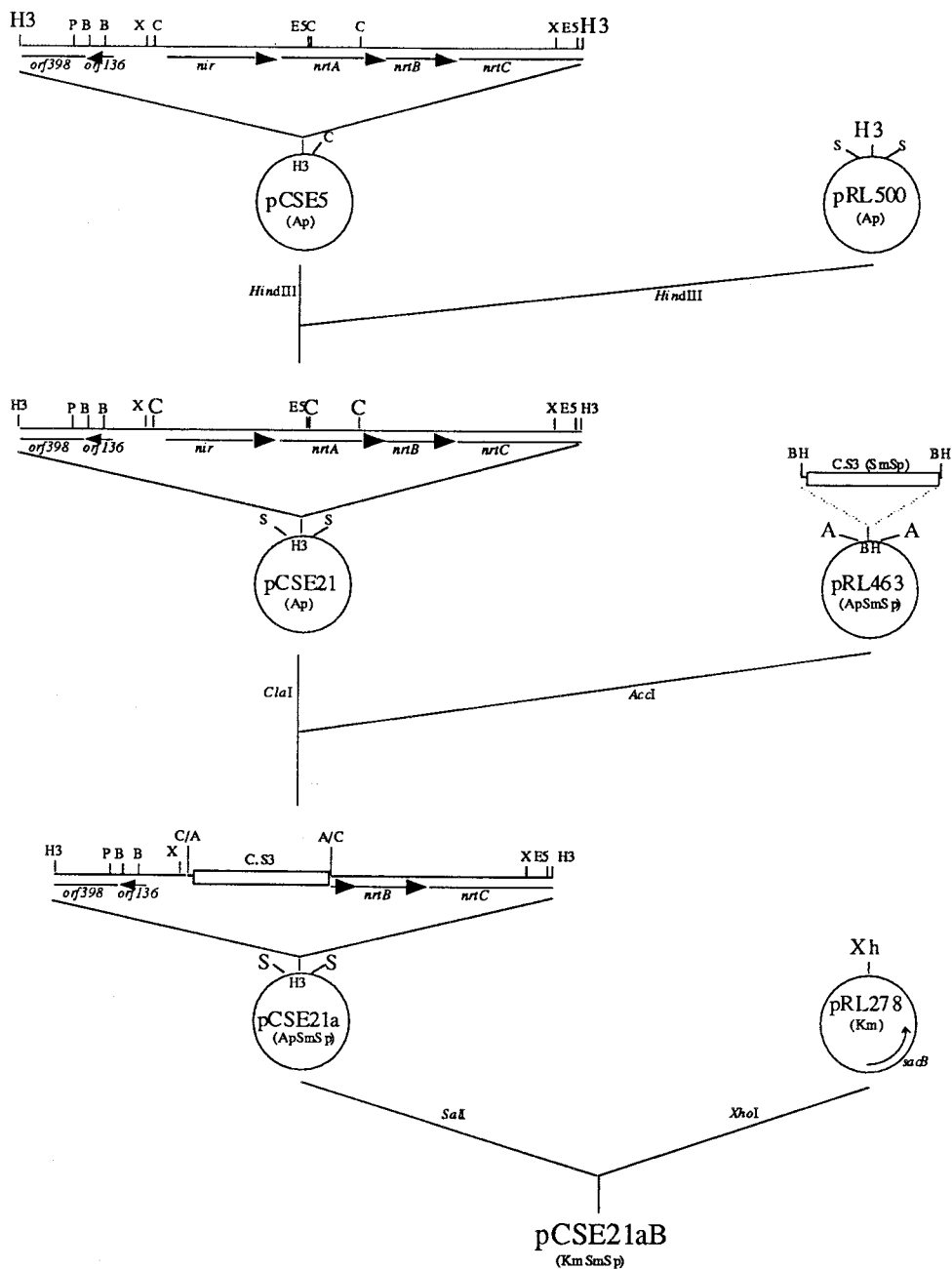


Figura 4. Esquema de la construcción del plásmido pCSE21aB, usado para la generación de la estirpe CSE1.

El plásmido pCSE5 se digirió con *HindIII* y su inserto se ligó al vector pRL500 (Elhai y Wolk, 1988a) para dar lugar al plásmido pCSE21. La casete de resistencia C.S3 (procedente de pRL463; Elhai y Wolk, 1988a), que proporciona resistencia a estreptomicina y espectinomicina, delimitada por dianas *AccI* se ligó a pCSE21 digerido con *ClaI*, originándose el plásmido pCSE21a. Por último, el inserto de pCSE21a se extrajo con *SalI* y se ligó a pRL278 (Cai y Wolk, 1990), en su sitio *XhoI*, para producir el plásmido pCSE21aB. Se muestran todos los genes y ORFs identificados en la región clonada. Abreviaturas: H3, *HindIII*; P, *PvuII*; B, *BglI*; X, *XbaI*; C, *ClaI*; E5, *EcoRV*; S, *SalI*; BH, *BamHI*; Xh, *XhoI*; A, *AccI*.

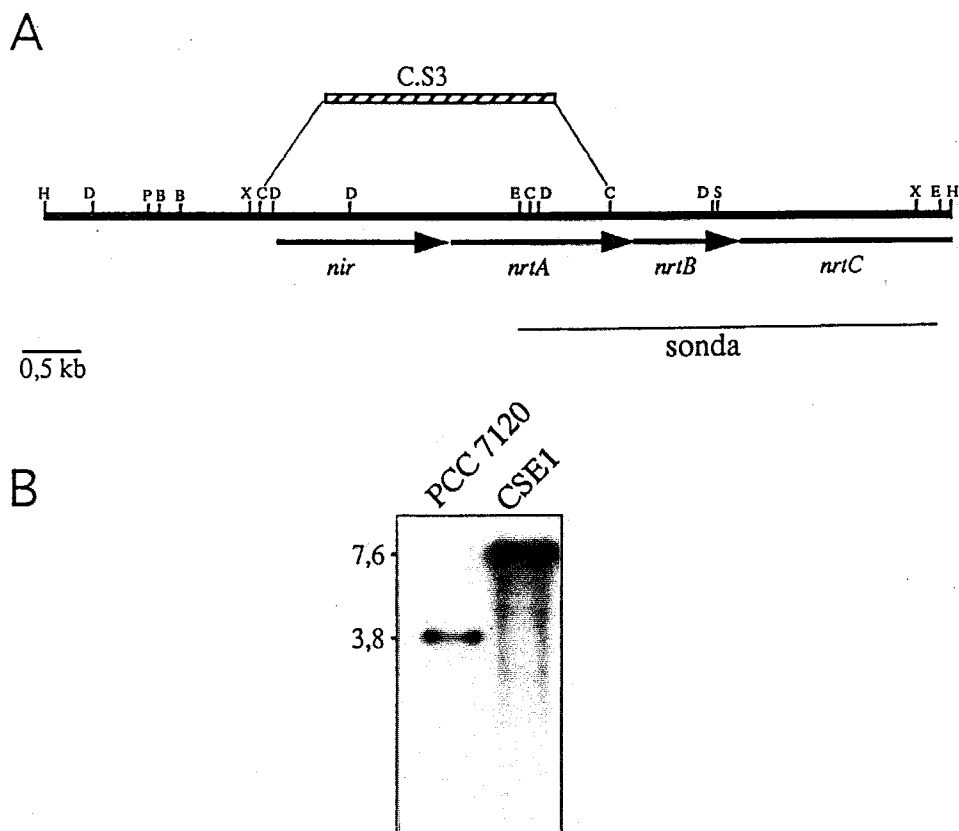


Figura 5. Análisis de la estructura genómica de la estirpe CSE1

(A) Estructura de la parte del operón de asimilación de nitrato contenida en pCSE5 y disposición de las dianas *Cla*I entre las que se insertó la casete C.S3 para la generación de la estirpe CSE1. Se indica el fragmento de DNA usado como sonda en el análisis de Southern mostrado en la figura 5B.

(B) Análisis de Southern de la estructura cromosómica de la región *nir* en la estirpe mutante CSE1. El DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la estirpe CSE1 se digirió con *Eco*RV y se sometió a análisis de Southern usando la sonda indicada anteriormente. A la izquierda se muestran los tamaños de los fragmentos de DNA detectados en la estirpe silvestre y en la mutante.

Se realizaron curvas de crecimiento de la estirpe mutante CSE1 en medios con distintas fuentes de nitrógeno. A diferencia de su parental, *Anabaena* sp. EF116, la estirpe CSE1 era incapaz de crecer a expensas de nitrato, mientras que crecía a una tasa similar a la del parental en medios que contenían amonio (Fig. 6). Estos resultados indicaban que la región clonada estaba realmente implicada en la asimilación de nitrato en *Anabaena* sp. PCC 7120.

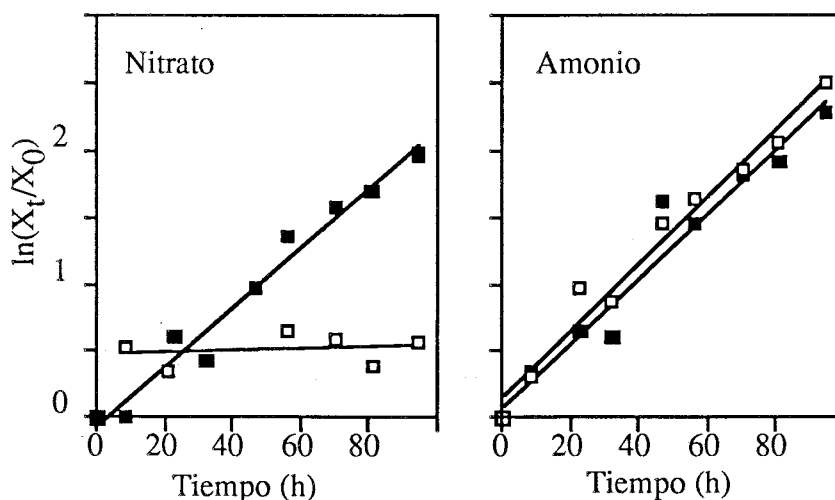


Figura 6. Crecimiento de la estirpe mutante CSE1 en medio con nitrato o con amonio.

Células de las estirpes CSE1 (□) y EF116 (■) cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo nitrato o amonio. Se inoculó a razón de $0,2 \mu\text{g}$ de clorofila· ml^{-1} . Las suspensiones resultantes se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada cultivo para la determinación de la concentración de proteína (apdo. 2.1.1.2). X_t , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo t ; X_0 , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo cero.

Por otra parte, se midieron los niveles celulares de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en la estirpe mutante CSE1 así como en su parental EF116. Ambas estirpes presentaban niveles bajos de ambas actividades en medios con amonio. No obstante, a diferencia de los altos niveles de expresión de las dos actividades enzimáticas observados en la estirpe EF116 en medio conteniendo nitrato como única fuente de nitrógeno combinado, en la estirpe CSE1 dichas actividades eran muy bajas o indetectables (Tabla 3). La ausencia de actividad nitrito reductasa en la estirpe CSE1 se podía explicar en base a que durante su generación se había eliminado el gen *nir* que cifra esta proteína. El hecho de que la introducción en la zona de los genes *nir-nrtA* de una casete portadora de terminadores de transcripción provocase la pérdida de actividad nitrato reductasa sugería que el gen estructural de la nitrato reductasa, *narB*, estuviese ligado al gen *nir* y que ambos genes formasen parte de la misma unidad transcripcional.

Tabla 3. Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de la estirpe mutante CSE1.

Células de las estirpes indicadas cultivadas con amonio se lavaron y se resuspendieron en medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. Tras incubar en condiciones de cultivo durante 5 horas, se determinaron las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Estirpe	Nitrato reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)			Nitrito reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)		
	Fuente de nitrógeno			Fuente de nitrógeno		
	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺
EF116	72,29	5,07	3,37	30,62	3,43	0
CSE1	0	0	0	0	0	0

3.1.3. Mutantes del gen *nrtA*

La proteína NrtA es considerada como la proteína de unión a sustrato ("binding protein") del sistema transportador de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Omata *et al.*, 1993; Omata, 1991). Con el fin de determinar la posible implicación del gen *nrtA* en el transporte de nitrato en *Anabaena* sp. PCC 7120, se procedió a la generación de mutantes de dicho gen y al estudio de sus fenotipos.

Se construyeron versiones mutadas del gen *nrtA* mediante inserción, en el sitio de restricción *EcoRV* interno a este gen, de la casete de resistencia a neomicina C.K1 (Elhai y Wolk, 1988a) en ambas orientaciones. Esta casete de resistencia no presenta terminadores de transcripción (Mazodier *et al.*, 1985) y su promotor se expresa débilmente en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Elhai, 1993). Los plásmidos obtenidos, pCSE44B y pCSE45B (C.K1 en el mismo sentido o en sentido contrario a *nrtA*, respectivamente) (ver Fig. 7) se transfirieron mediante conjugación a *Anabaena* sp. PCC 7120 (apdo 2.3.1). En este caso, la sucesión de medios utilizada durante la conjugación fue: BG110 + LB 5%, BG110 y BG110 + Nm. Un clon resultante de cada conjugación se sometió a cultivo líquido, fragmentación de los filamentos y siembra de diluciones en medios con sacarosa para la selección de dobles recombinantes. Posteriormente se estudió, mediante análisis de Southern, la estructura genómica de varios de los clones obtenidos en cada caso. En todos ellos la versión silvestre de *nrtA* (fragmento *ClaI* de 2,3 kb) había sido sustituida por la versión mutante *nrtA*::C.K1 (fragmento *ClaI* de 3,6 kb) (Fig. 8). Se denominó CSE9 y CSE10 a dos estirpes que portaban la casete C.K1 insertada en *nrtA*, en el mismo sentido o en sentido contrario a *nrtA*, respectivamente.

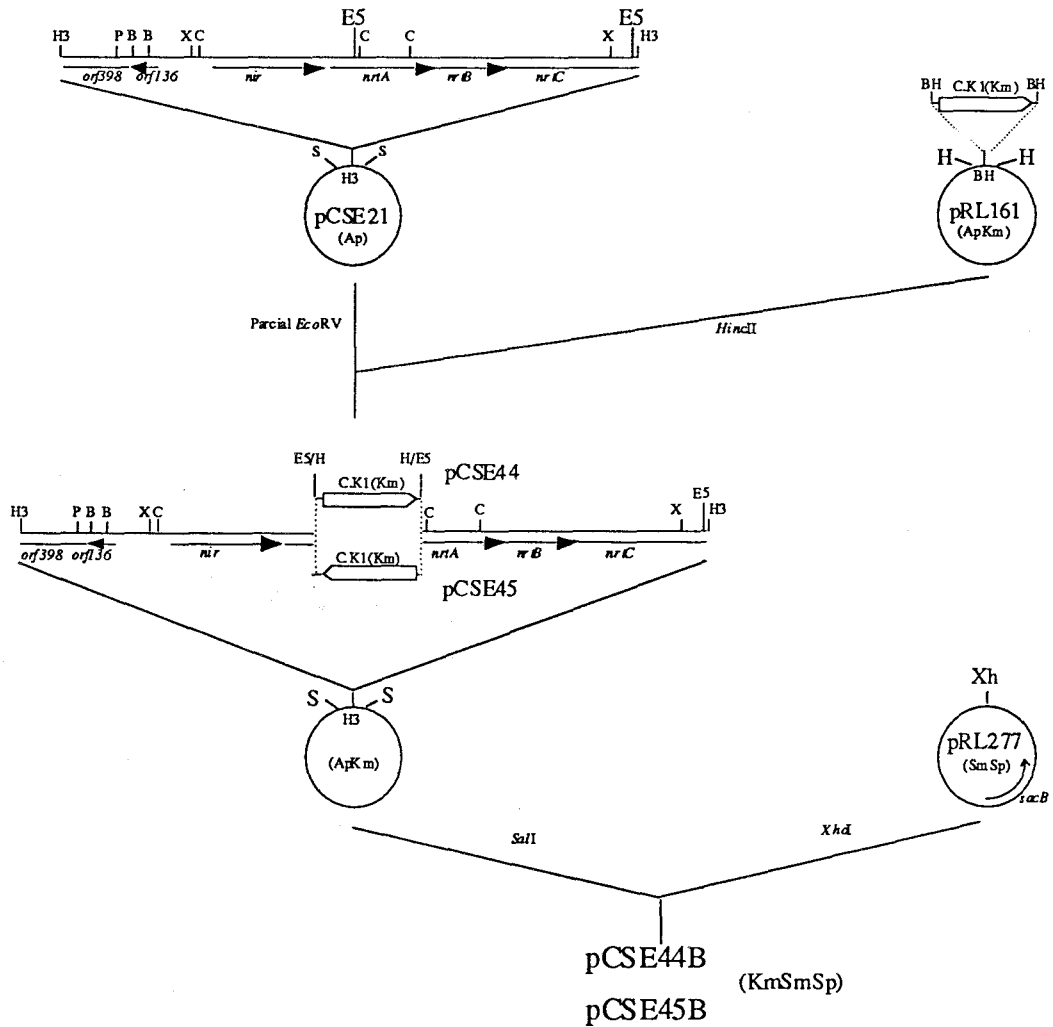


Figura 7. Esquema de la construcción de los plásmidos pCSE44B y pCSE45B, usados para la generación de las estirpes CSE9 y CSE10, respectivamente.

Para la construcción de los plásmidos pCSE44B y pCSE45B, la casete C.K1, procedente de pRL161 (Elhai y Wolk, 1988a) digerido con *HincII*, se clonó en la única diana *EcoRV*, interna a *nrtA*, de pCSE21 (ver Fig. 4), originándose los plásmidos pCSE44 y pCSE45 (con C.K1 en la misma orientación o en orientación contraria a *nrtA*, respectivamente). El inserto de cada plásmido, limitado por dianas *SalI*, se clonó en el sitio *XhoI* de pRL277 (Cai y Wolk, 1990) para generar los plásmidos pCSE44B y pCSE45B, respectivamente. Abreviaturas: H3, *HindIII*; P, *PvuII*; B, *BglI*; X, *XbaI*; C, *Clal*; E5, *EcoRV*; S, *Sall*; BH, *BamHI*; Xh, *XhoI*; H, *HincII*.

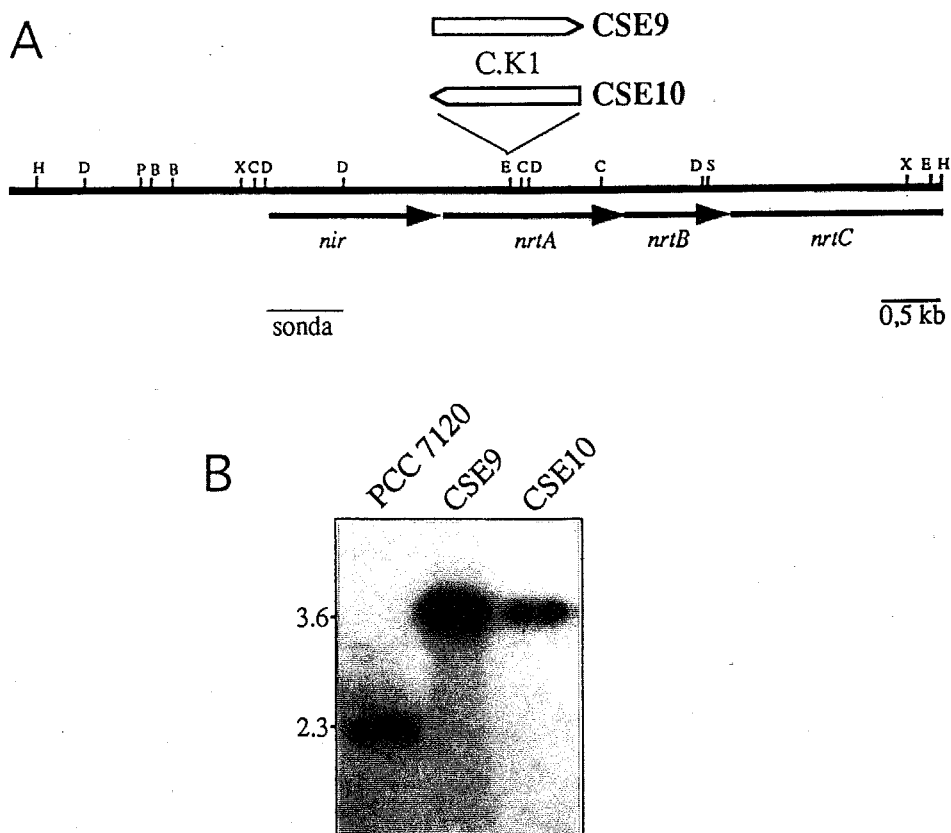


Figura 8. Análisis de la estructura genómica de las estirpes CSE9 y CSE10.

(A) Se muestra la estructura de la parte del operón de asimilación de nitrato contenida en pCSE5 y la posición de la diana *EcoRV*, interna a *nrtA*, en la que se insertó la casete C.K1 (Elhai y Wolk, 1988a) para la generación de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10 (C.K1 en la misma orientación o en orientación contraria a *nrtA*, respectivamente). Se indica el fragmento de DNA usado como sonda en el análisis de Southern mostrado en la figura 8B.

(B) Análisis de Southern de la estructura cromosómica de la región *nir* en las estirpes mutantes CSE9 y CSE10. El DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes CSE9 y CSE10 se digirió con *ClaI* y se sometió a análisis de Southern usando la sonda indicada anteriormente. A la izquierda se muestran los tamaños (en kb) de los fragmentos de DNA detectados en la estirpe silvestre y en las estirpes mutantes.

Se determinó la capacidad de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10 de crecer a expensas de distintos nutrientes nitrogenados (Fig. 9). Las estirpes CSE9 y CSE10 crecían a una tasa similar a la de su parental *Anabaena* sp. PCC 7120 en medios con amonio o sin nitrógeno combinado. En medios con nitrato, aunque los dos mutantes crecían, ambos lo hacían a tasas inferiores a la de la estirpe silvestre y presentando heterocistos, lo que es indicativo de un cierto grado de deficiencia en nitrógeno y sugiere una cierta incapacidad de utilización del nitrato como fuente de nitrógeno.

Los niveles de nitrato reductasa y nitrito reductasa en las estirpes mutantes CSE9 y CSE10 eran similares a los de la estirpe parental en cultivos con las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas (Tabla 4).

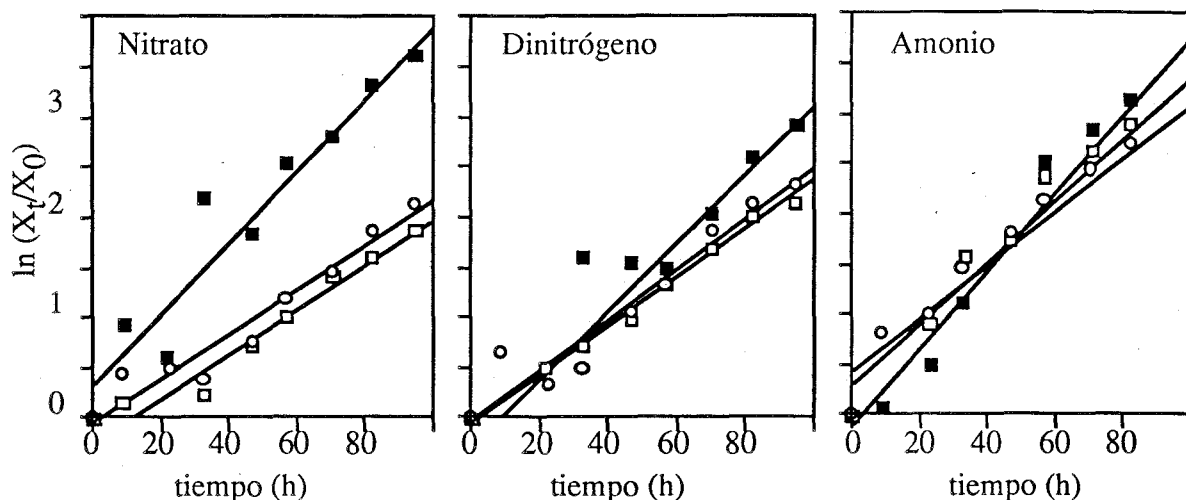


Figura 9. Crecimiento de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10 en medio con nitrato, sin nitrógeno combinado o con amonio.

Células de *Anabaena* sp. PCC 7120 (■) y de las estirpes CSE9 (□) y CSE10 (○) cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo amonio, nitrato (17,6 mM) o sin nitrógeno combinado. Se inoculó a razón de $0,2 \mu\text{g}$ de clorofila· ml^{-1} . Las suspensiones celulares obtenidas se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada cultivo para la determinación de la concentración de proteína (apdo. 2.1.1.2). X_t , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo t ; X_0 , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo cero.

Tabla 4. Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10.

Células de las estirpes que se indican cultivadas con amonio se lavaron y se resuspendieron en los medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. Tras incubación en condiciones de cultivo durante 5 horas, se determinaron las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Estirpe	Nitrato reductasa ($\text{mU}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$)			Nitrito reductasa ($\text{mU}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$)		
	Fuente de nitrógeno			Fuente de nitrógeno		
	NO_3^-	N_2	NH_4^+	NO_3^-	N_2	NH_4^+
PCC 7120	84,7	14,4	12,6	25,0	10,6	2,55
CSE9	82,2	11,4	12,9	26,9	9,1	0,82
CSE10	102,7	11,8	4,5	37,0	19,9	1,57

Se investigó la capacidad de consumir nitrato de las estirpes CSE9 y CSE10 (Tabla 5). El consumo de nitrato se estimó de dos maneras distintas: midiendo la desaparición del nitrato del medio de cultivo (cuando la concentración externa de nitrato era de $0,1 \text{ mM}$; ver apdo. 2.2.5) o midiendo la liberación de amonio dependiente de

nitrate en células tratadas con MSX (cuando la concentración de nitrato externa era de 17,6 mM; ver apdo. 2.2.5). Mientras que las estirpes mutantes mostraban una baja actividad de consumo de nitrato cuando éste se encontraba en el medio externo a concentración 0,1 mM (Tabla 5), mostraban una actividad de consumo mayor cuando la concentración era de 17,6 mM. Estos datos indican, por una parte, que las estirpes CSE9 y CSE10 están afectadas en el transporte activo de nitrato, y por tanto que el gen *nrtA* se requiere para dicho transporte en *Anabaena* sp. PCC 7120, y, por otra parte, que el gen *nrtA* es dispensable para el consumo a altas concentraciones de nitrato. De todas formas, el gen *nrtA* y, por tanto, el transporte activo, parecen contribuir a la tasa total de entrada de nitrato en la célula incluso a altas concentraciones de este sustrato.

Tabla 5. Tasa de consumo de nitrato de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes CSE9 y CSE10.

Células de las estirpes que se indican, cultivadas con amonio, se transfirieron a medio con nitrato (17,6 mM) y se incubaron en condiciones de cultivo durante 5 h previamente a la medida del consumo (ver apdo. 2.2.5). El consumo de nitrato se midió, cuando se usaban células tratadas con MSX y una concentración de nitrato de 17,6 mM, como aparición de amonio en el medio o, cuando se usaba una concentración de nitrato de 0,1 mM, como desaparición del ion del medio extracelular. Los resultados de consumo de nitrato en presencia de 17,6 mM y 0,1 mM de NaNO_3 no son comparables entre sí al haberse realizado en condiciones experimentales diferentes. En el primer caso los datos se expresan como nmol NH_4^+ (producido) $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ y en el segundo como nmol NO_3^- (desaparecido) $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de clorofila

Estirpe	Tasa de consumo de nitrato	
	Concentración de nitrato:	
	17.6 mM	0.1 mM
PCC 7120	203,6	544,4
CSE9	175,5	49,2
CSE10	84,0	9,5

3.1.4. Estudios de expresión del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato

Se analizó la expresión del agrupamiento de genes clonado. Para ello se realizaron experimentos de "Northern" en los que se usaba RNA total de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y, como sonda, la región N-terminal del gen *nir*. El RNA se aisló a partir de células procedentes de cultivos en fase exponencial conteniendo amonio o nitrato o sin nitrógeno combinado. Alternativamente (experimentos de inducción), el RNA se aisló de células cultivadas con amonio,

también recogidas en fase exponencial, e incubadas en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno durante 3 h. En ambos casos el resultado fue similar: se obtenía una fuerte hibridación con RNAs procedentes de células incubadas con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado pero no con RNAs de células cultivadas con amonio (Fig. 10, paneles A y B). En estos experimentos no se obtenían bandas definidas de hibridación, sino hibridación con RNAs de entre 0,3 y 6 kb, lo cual apunta a una baja estabilidad del RNAm del gen *nir*. Por otra parte, la observación de hibridación con RNAs de hasta 6 kb sugirió que el gen *nir* se transcribía junto con otros genes del agrupamiento.

Un resultado similar se obtuvo en experimentos de "Northern" en los que se usaban RNAs de experimentos de inducción y como sonda la región central del gen *nrtA* (Fig. 10, panel C).

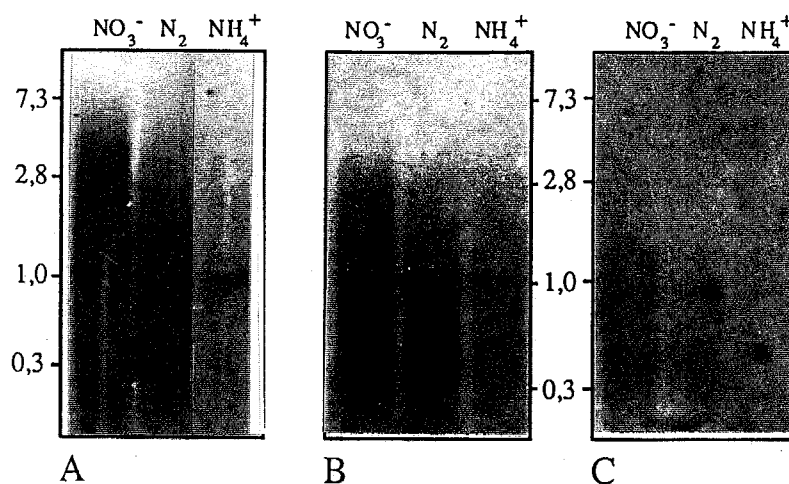


Figura 10. Estudio de la expresión de los genes *nir* y *nrtA* mediante análisis de "Northern".

El RNA utilizado procedía de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio, con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado (panel A) o de células cultivadas con amonio y transferidas a medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado durante 3 h (paneles B y C). El RNA se hibridó con el fragmento *Dra*I de 0,7 kb de la zona N-terminal del gen *nir* (paneles A y B) o con el fragmento *Cl*aI de 548 pb interno al gen *nrtA* (panel C). Se indican la posición y longitud (en kb) de algunos patrones de tamaño.

Para analizar en más detalle si el agrupamiento de genes clonado se comportaba como operón, se llevaron a cabo experimentos de "Northern" con RNAs aislados de la estirpe mutante CSE1 y de su parental, *Anabaena* sp. EF116, utilizando sondas de distintos genes del agrupamiento. Los RNAs se aislaron de células cultivadas con amonio que se incubaban, durante 3 h, en medios conteniendo nitrato o carentes de nitrógeno combinado. Se usaron sondas internas a los genes *nrtB*, *nrtC* y *narB* y, además, el oligonucleótido *nir-3* (cuya secuencia se sitúa delante de la del gen *nir*). No se usaron sondas para los genes *nir* ni *nrtA* al estar estos genes eliminados total o parcialmente en el genoma de la estirpe CSE1.

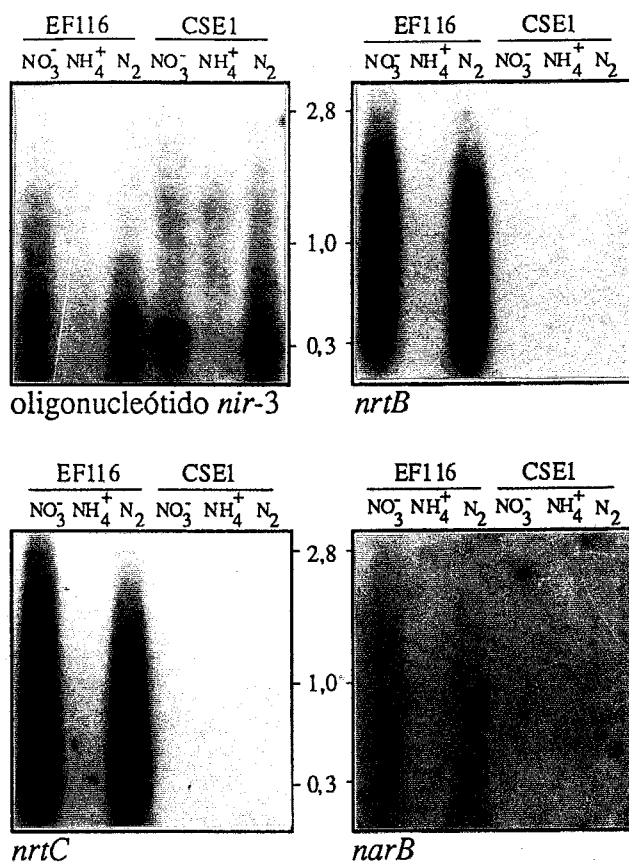


Figura 11. Expresión del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato en la estirpe mutante CSE1 y en *Anabaena* sp. EF116.

El RNA utilizado procedía de células de CSE1 y EF116 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado durante 3 h. Las sondas utilizadas fueron: oligonucleótido *nir-3* (apdo. 2.7.2), fragmento *Bst*NI de 0.4 kb interno al gen *nrtB*, fragmento *Xba*I-*Hind*III de 0.35 kb interno al gen *nrtC* y fragmento *Eco*RI-*Acc*I de 1564 pb que abarca la mayor parte del gen *narB* (Cai y Wolk, sin publicar; ver Fig. 12). Entre los paneles se indican la posición y longitud (en kb) de algunos patrones de tamaño.

En todos los casos se obtuvo una fuerte hibridación de las diferentes sondas con RNAs de la estirpe EF116 cultivada con nitrato o incubada sin nitrógeno combinado, pero no con RNA de la misma estirpe procedente de cultivos con amonio (Fig. 11). Sin embargo, no se obtuvo señal alguna de hibridación con RNAs de la estirpe CSE1 cuando se usaron sondas de los genes *nrtB*, *nrtC* o *narB*, todos ellos situados detrás de la casete C.S3. Sí se obtuvo hibridación con el oligonucleótido *nir-3*, correspondiente a una secuencia situada delante de la casete C.S3, y RNAs de cultivos con nitrato o de células incubadas sin nitrógeno combinado, pero no con RNA de cultivos con amonio (Fig. 11). Los resultados de los análisis de "Northern" presentados indican que los distintos genes del agrupamiento se reprimen por amonio (expresándose en ausencia de amonio tanto en presencia de nitrato como en ausencia de nitrógeno combinado). La observación de que el patrón de hibridación fuese similar para todos los genes del agrupamiento y, sobre todo, el hecho de que la introducción de terminadores de

transcripción en una zona del agrupamiento de genes (introducción de C.S3 en CSE1) provocase la no expresión de los genes situados detrás de esos terminadores, indican que dicho agrupamiento de genes constituye un operón.

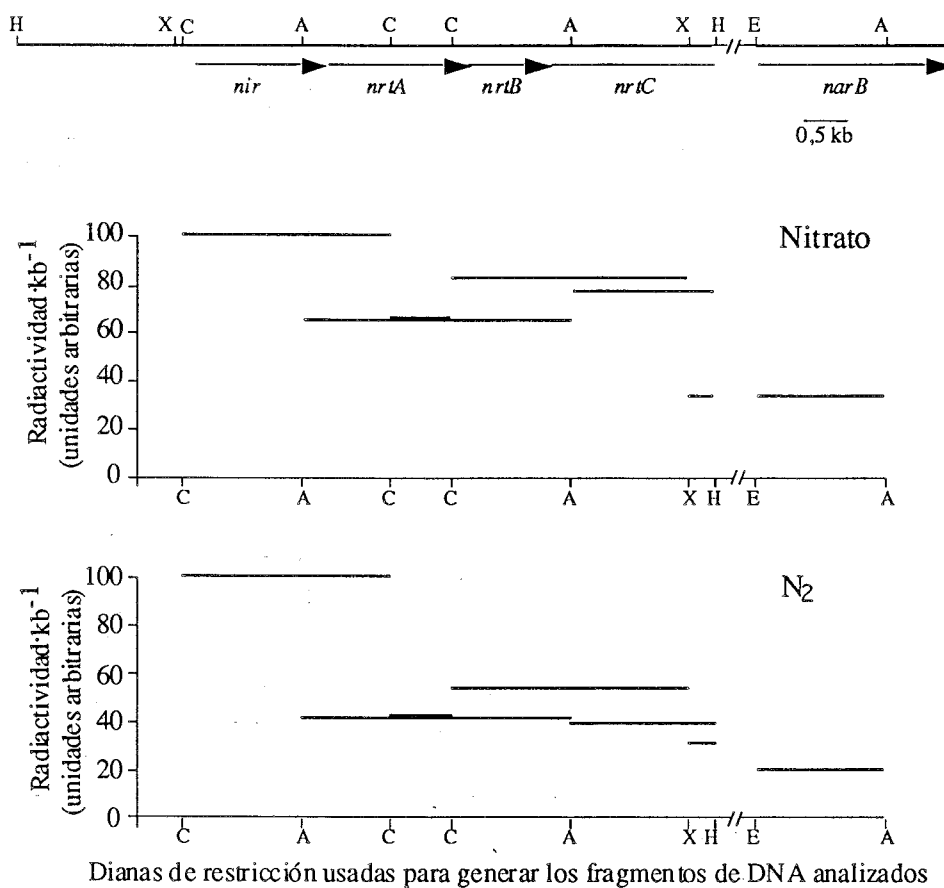


Figura 12. Niveles de RNAm de diferentes regiones del operón *nir*.

Cantidades equimoleculares (2,1 pmol) de los plásmidos pCSE21 (ver Fig. 4) y pRL822RM2 (pUC19 con un fragmento *EcoRI-MunI* de 1630 pb que abarca la mayor parte del gen *narB*, cortesía de Y. Cai y C. P. Wolk) se digirieron con enzimas de restricción. Los fragmentos de restricción resultantes se separaron en geles de agarosa al 1% y se transfirieron a membranas de nylon Gene Screen Plus (Dupont), que se hibridaron con 15 μ g de RNA, marcado con (γ -³²P)dATP (apdo 2.7.4), aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio e incubadas durante 3 h en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado. Los resultados se cuantificaron con un Instantimager (Packard) y se normalizaron como $\text{cpm}\cdot\text{kb}^{-1}$. La cantidad de radiactividad asociada a cada fragmento se expresa como porcentaje de la radiactividad asociada al fragmento que mostraba mayor marcaje en cada experimento (el valor 100% obtenido en el experimento con RNA de células incubadas con nitrato es distinto al obtenido en el experimento con RNA de células incubadas sin fuente de nitrógeno combinado). Abreviaturas: A, *AccI*; C, *Clal*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; X, *XbaI*.

Para estimar la relación entre los niveles de expresión de los distintos genes del operón *nir* se llevaron a cabo experimentos de hibridación entre el DNA de distintos fragmentos del operón (inmovilizados en filtros) y RNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 marcado con ³²P. El DNA se preparó a partir de los plásmidos pCSE21, que portaba los genes *nir*, *nrtA*, *nrtB* y parte de *nrtC*, y pRL822RM2, que portaba la mayor

parte del gen *narB* (cortesía de Y. Cai y C. P. Wolk), digeridos con diversos enzimas de restricción (Fig. 12).

Tanto en cultivos con nitrato como sin nitrógeno combinado, se observaba una disminución progresiva del nivel de RNAm del extremo 5' al 3' del operón. Además, mientras que en cultivos con nitrato el nivel de RNAm del gen *narB* suponía un 33% del mostrado por el gen *nir*, el nivel de RNAm de *narB* suponía sólo un 19% del de *nir* en cultivos sin nitrógeno combinado. En ambos casos, para los genes *nrtABC* se observaban niveles intermedios de RNAm (Fig. 12).

Se procedió a realizar experimentos de elongación del cebador con RNA total de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno (Fig. 13). Como cebadores se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: *nir-2* (interno al gen *nirA*), *nir-3* y *nir-1* (complementarios a secuencias situadas 300 y 345 pb por delante del ATG de *nir*, respectivamente) (ver Materiales y Métodos, apdo 2.7.2).

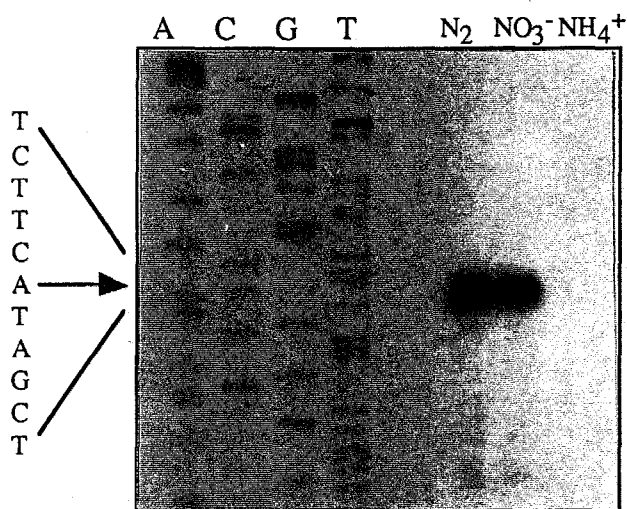


Figura 13. Determinación del inicio de transcripción del gen *nir*.

RNA total (50 μ g), aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 en creciendo exponencialmente con amonio, con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado, se incubó en presencia del oligonucleótido *nir-1* (apdo 2.7.2) en experimentos de elongación del cebador. Los carriles A, C, G y T contienen una escalera de secuenciación obtenida por el método de Sanger, utilizando el mismo oligonucleótido como cebador. A la izquierda se indica la secuencia de la zona que contiene el sitio de parada de la retrotranscripción (señalado con una flecha).

Utilizando el oligonucleótido *nir-1* se detectó el extremo 5' de un RNAm que correspondería a un inicio de transcripción localizado 460 pb por delante del codón de iniciación de *nir* (Fig. 13). Este inicio se utilizaba en cultivos con nitrato o sin nitrógeno combinado pero no en cultivos con amonio, patrón de expresión coincidente con el observado en los experimentos de "Northern", y delimitaría una región líder de tamaño notable (460 pb), localizada entre él y el inicio de traducción del gen *nir* (Fig. 14), en la que no se identificó ninguna ORF evidente.

```

TTCATAGCCACTGAAGTTATGTATTAGTTGTAAACAAAAGTCTAGCCTTGTTTTACCAACATTTTTAGC 70
TACTCATTAGTTAAGTGTAATGCAGAAAACGCATATTCTCTATTAAACTTACGCATTAATACGAGAATTT 140
Sitio de unión de NtcA
TGTAGCTACTTATACATATTTTACCTGAGATCCCGACA-10TAACCT+1TAGAAGTATCGAAATCGTTACATAAAC 210
ATTACACACAAACCACTTGACAAATTTAGCCAATGTAAAAGACTACAGTTTCTCCCCGGTTTGTAGTTCTAGA 280
XbaI
GTTACCTTCAGTGAACATCGGCGGCGTGTTCAGTCATTGAAGTAGCATAAAATCAATTCAAAATACCCTGC 350
GGGAAGGCTGCGCAACAAAATTAATATTTGGTTTTTCACTATTAGAGCATCGATTTCATTAATCAAAAAC 420
ClaI
CTTACCCCCAGCCCCCTTCCCTTGTAGGGAAGTGGGAGCCAAACTCCCTCTCCGCGTCGGAGCGAAAA 490
GTCTGAGCGGAGGTTTCTCCGAACAGAACTTTTAAAGAGAGAGGGGTTGGGGGAGAGGTTCTTTCAAGA 560
DraI
TTACTAAATTGCTATCACTAGACCTCGTAGAACTAGCAAAGACTACGGGTGGATTGATCTTGAGCAAAAA 630
AACTTTATGAGAACCAGCTCATG ACA GAT ACA GTA ACT ACC CCC AAA GCC AGC CTC 686
RBS met thr asp thr val thr thr pro lys ala ser leu
AAT AAG TTT GAG AAA TTC AAA GCC GAA AAA GAT GGA CTT GCC ATC AAG TCA 731
asn lys phe glu lys phe lys ala glu lys asp gly leu ala ile lys ser

```

Figura 14. Secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA que contiene la región líder del operón *nir* y la zona N-terminal de dicho gen. Se muestra asimismo la secuencia de aminoácidos del fragmento correspondiente de la proteína Nir.

Se indica el inicio de transcripción determinado (+1) para el gen *nir*, el cual se encuentra precedido por una caja -10 y un posible sitio de unión para la proteína reguladora NtcA situado a 22 pb de la caja -10 anterior. Este inicio de transcripción se sitúa a 460 pb del ATG del gen *nir*. Por último, se indica el comienzo del gen *nir* y un posible sitio de unión al ribosoma (RBS) (subrayado). Se señalan las dianas *XbaI*, *DraI* y *ClaI* de la región líder.

Para investigar la existencia en el operón *nir* de promotores internos, diferentes al detectado 460 pb por delante del gen *nir*, se procedió a la construcción de un mutante con la casete C.S3 (que porta terminadores de la transcripción) insertada en el sitio de restricción *ClaI* situado en la región líder del operón *nir* (ver Fig. 14). Para ello, el plásmido pCSE88B (ver Fig. 15) se transfirió mediante conjugación a *Anabaena* sp. EF116 (Materiales y métodos, apdo. 2.3.1). La sucesión de medios utilizada fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG110A + Sm + Sp. Se seleccionaron varios clones resistentes a Sm y Sp y a sacarosa. La estructura genómica de éstos se analizó mediante PCR (no mostrado).

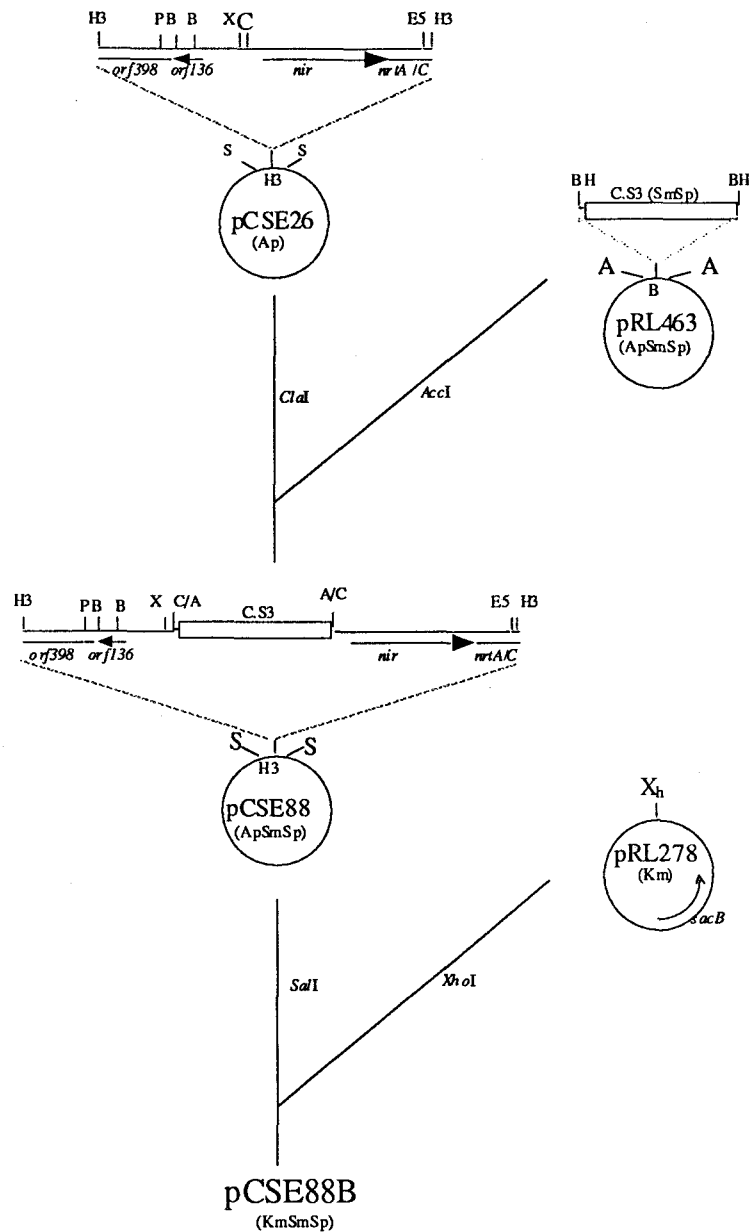


Figura 15. Esquema de la construcción del plásmido pCSE88B, usado para la generación de la estirpe CSE18.

La casete de resistencia a estreptomicina y espectinomicina C.S3 (Elhai y Wolk, 1988a), limitada por sitios *AccI*, se ligó al plásmido pCSE26 (este plásmido procedía de digerir el plásmido pCSE21 con *EcoRV* y religar el fragmento mayor generado), digerido con *ClaI*, para generar el plásmido pCSE88. El inserto de éste, limitado por sitios *SalI*, se ligó a pRL278, linearizado en su único sitio *XhoI*, para generar el plásmido pCSE88B. Abreviaturas: H3, *HindIII*; P, *PvuII*; B, *BglI*; X, *XbaI*; C, *ClaI*; E5, *EcoRV*; S, *Sall*; Xh, *XhoI*; D, *DraI*; A, *AccI*; A, *BamHI*.

La estirpe CSE18 no mostraba rastro alguno de cromosomas silvestres (no mostrado) y se eligió para su estudio. Esta estirpe era incapaz de crecer utilizando el nitrato como fuente de nitrógeno (no mostrado) y presentaba niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en medios con nitrato muy inferiores a los de su parental (Tabla 6). Estos datos se pueden interpretar en términos de ausencia de

actividad promotora, al menos en nuestras condiciones de cultivo, de las secuencias de DNA del operón *nir* situadas detrás del sitio *Clal* en el que se había insertado la casete C.S3 para generar la estirpe CSE18.

Tabla 6. Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de la estirpe mutante CSE18.

Células de las estirpes indicadas cultivadas con amonio se lavaron y se resuspendieron en medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. Tras incubar en condiciones de cultivo durante 5 horas, se determinaron las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Estirpe	Nitrato reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)			Nitrito reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)		
	Fuente de nitrógeno			Fuente de nitrógeno		
	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺
EF116	61,8	15,7	2,4	9,2	5,4	0,2
CSE18	0,7	0,6	0,3	0,2	0	0

3.1.5. Análisis de la región genómica anterior al operón *nir*

Delante del promotor del operón *nir* identificado se localizaron, mediante secuenciación, dos ORFs dirigidas en sentido opuesto al gen *nir*, una que determinaría un polipéptido de 136 (*orf136*) y otra de 398 (*orf398*) aminoácidos (Fig. 16). La comparación de las secuencias de la *orf136* y *orf398* con los bancos de datos (Devereux *et al.*, 1984) reveló que el producto de la *orf136* mostraría homología con proteínas de transferencia de electrones (por ej., 30% de aminoácidos idénticos con uno de los componentes del complejo citocromo *b₆-f* de *Synechocystis* sp. PCC 6803) y el de la *orf398* con proteínas de la familia CpcE/RpcE/PceE (por ej., 24% de aminoácidos idénticos con la proteína CpcE de *Synechococcus* sp. PCC 7002) que incluye enzimas implicados en la síntesis de bilinas o en la cromoforilación de biliproteínas.

Figura 16. Secuencia de nucleótidos de la región de DNA que contiene a la *orf136* y a la *orf398*. Se muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas deducidas en cada caso.

Se muestra el inicio de transcripción (+1) de la *orf136* (ver texto más adelante), el cual está precedido por un promotor próximo al consenso de los promotores σ^{70} de *E. coli*. Este inicio de transcripción se sitúa a 144 pb del ATG de la *orf136*. Se señalan, además, los sitios de restricción *Bgl*I y *Pvu*II usados para la inserción de la casete C.S3 en la *orf136* y la *orf398*, respectivamente. También se muestra el sitio *Hind*III que limita al inserto de pCSE5. A partir de este punto se secuenció utilizando un clon solapante (no mostrado). Esta secuencia está depositada en el banco de datos con el número de acceso X99708.

ATACTTCTAAGGTTATGTCGGGATCTCAGGTAATAATAGTATAAGTAGCTACAAAATCTCGTATTAATCGGTAAGTTTAAATAGAGAA 87
 -35 -10 +1
 TATGCGTTTTCTGCATTACTTAACATAATGAGTAGCTAAAAATGTTGGTAAACAAGGCTAGACTTTTGTTTTACAACATAATACATA 174
 ACTTCAGTGGCTATG AAA CGT CGG GAT TTC ATC AAT TGG GTA GGT TTG GGT TGG ATA GCA AGT AGC TTA 243
orf136 Met lys arg arg asp phe ile asn trp val gly leu gly trp ile ala ser ser leu
 CCT GTA GCG ATC GCT GCT TGT TCT TCC CAG CCC ACA ACA TCT ACA GAG GGG CAA GCG ATC GGG ACT 309
 pro val ala ile ala ala cys ser ser gln pro thr thr ser thr glu gly gln ala ile gly thr
 GTT GCT GAA CTA GAT AAA ACT GGT CAA TTA CTC AAC GAA AAT TCA CCA ATT GGC CCG GTG TTG GTC 375
 val ala glu leu asp lys thr gly gln leu leu asn glu asn ser pro ile gly pro val leu val
 GTG GGT ACA TCT AAG GAC GCA AAT CTG ATT GCT GTC AAT CCT ACT TGT AGC CAC AAA GGC TGT ACC 441
 val gly thr ser lys asp ala asn leu ile ala val asn pro thr cys ser his lys gly cys thr
 BglI
 GTA GCA TGG CAA GCC CAA GCG AAG AAA TTT GTC TGC CCA TGT CAT GGC GCA GAA TAT GGA GTT GAT 507
 val ala trp gln ala gln ala lys lys phe val cys pro cys his gly ala glu tyr gly val asp
 GGT AAA GTG CAG AAA GAC CCA GCT ACA AAA CCA CTC AAA ACT TAC GCC GCC AAG ATT GAG GGT GAT 573
 gly lys val gln lys asp pro ala thr lys pro leu lys thr tyr ala ala lys ile glu gly asp
 TCA GTT GTA GTC AAG CAA AGC TAGGTGTGAGCAAGTAGGAAGCAGGGAGCAGGGAAAGATTTATTCTCAGCACTCAGCA 653
 ser val val val lys gln ser AMB
 CTGGCTAAACGCCGACTACTGCTCTCAGCGCAGTATTGCCCGTAGGGCTTTACAGCACTCAAACCTTCGCTATTCCAAAGGTATT 740
orf398
 GTG AAT AAT ATC GGT CAA ATT TTA GTG CAA GCG CAG GCG GCG CAT AGT GCA GAT GAT TTG TCA TTG 806
 Met Asn Asn Ile Gly Gln Ile Leu Val gln ala gln ala ala his ser ala asp asp leu ser leu
 PvuII
 GTG ATT AAT AAT CTG CAA CAG CTG ATT TTA GCA GAT ACA CAT GAC ACG GCT AAT TCA GAA CAA CTG 872
 val ile asn asn leu gln gln leu ile leu ala asp thr his asp thr ala asn ser glu gln leu
 CTG GAA TTA GCA CTC TCT ATT TTT GAG TTG GGA GAT TTT CAG CAA CGT TGG GAT ATT GCC AAA GTG 938
 leu glu leu ala leu ser ile phe glu leu gly asp phe gln gln arg trp asp ile ala lys val
 TTA GTT AAT TTG GGC AAT GTG ACC ATC AAC CCA TTA ATT GAC ATC CTA GAA GAT GAA GAC GCA GAG 1004
 leu val asn leu gly asn val thr ile asn pro leu ile asp ile leu glu asp glu asp ala glu
 GAT GAA TTG GCG TGG TTT GCT GCC CGA ATT TTA GGT GAA TTG CAG CAC CCA GAG GCG ATT ATG CCT 1070
 asp glu leu arg trp phe ala ala arg ile leu gly glu leu gln his pro glu ala ile met pro
 CTG GTG GAA TTG TTG AAA ACT AGT GAT GAT GAG GAA ATT AAA GCG ATC GCC TCA TCA GCA ATA GCG 1136
 leu val glu leu leu lys thr ser asp asp glu glu ile lys ala ile ala ser ser ala ile ala
 CAA ATG GGT ACA ATC GCC ATT CCG GTA ATT GTT GAA CTC TTA GCA CAA GAA AAT ACA AGA CTT TTG 1202
 gln met gly thr ile ala ile pro val ile val glu leu leu ala gln glu asn thr arg leu leu
 GCA GTG CGA TCG CTT GCT TAT ATC CGA CAT ACA CAA ACC ATC GCC CCT CTG TTG AGT GTG GTA CAA 1268
 ala val arg ser leu ala tyr ile arg his thr gln thr ile ala pro leu leu ser val val gln
 GAT ACC CAA GCA TCT ATC CGC GCC GCA GCT ATC GAA GCT CTC AGC AGT TTT CAT GAT CAA CGT GTA 1334
 asp thr gln ala ser ile arg ala ala ala ile glu ala leu ser ser phe his asp gln arg val
 CCA CCT ATA CTG TTG AAC GCT TTA AAT GAT CTA TCT GCC ACA GTT AGA CGT ACA GCG ATT CAG GGT 1400
 pro pro ile leu leu asn ala leu asn asp leu ser ala thr val arg arg thr ala ile gln gly
 TTA AGT TTT CGC TCT GAT TTA TCT TCA GAA TTA AAT TTG GTA GCT CAA ATT CAA CCC AAA CTC TAC 1466
 leu ser phe arg ser asp leu ser ser glu leu asn leu val ala gln ile gln pro lys leu tyr
 GAT TTT AAT ATA GAG GTT TGC TGT GCA GCC GCC AAT GCT CTG GCG CGT ATG GGT GGT GAT GAT GCA 1532
 asp phe asn ile glu val cys cys ala ala ala asn ala leu ala arg met gly gly asp asp ala
 GCT CAG CAT TTA TAT AAG GCT CTA ATA TCA GCT CAT ACA CCC ATT ACC TTA CAA CTA GAA ATC ATC 1598
 ala gln his leu tyr lys ala leu ile ser ala his thr pro ile thr leu gln leu glu ile ile
 CGC GCT TTA GTT TGG TTA GAA TCG CTT ATT AGC CTG GAA TAT TTA CAA CAA GCA TTT AAT CAA GTC 1664
 arg ala leu val trp leu glu ser leu ile ser leu glu tyr leu gln gln ala phe asn gln val
 ACA ACA GAA ACA CTA TGG CAA GAA ATT GTC ACA GTT CTA GGA AGA ATA CAA AAG CCT GAG TTA AAA 1730
 thr thr glu thr leu trp gln glu ile val thr val leu gly arg ile gln lys pro glu leu lys
 ACA CCA GCC ACA GCC ATT CTA TTA GAG ATA CTG AAC TCG CCA CAT CCA GCT ACA AAA ATT CAT AGT 1796
 thr pro ala thr ala ile leu leu glu ile leu asn ser pro his pro ala thr lys ile his ser
 HindIII
 ATG AAA AGT GCG ATC GCC TTA TCT TTG GGT CAG CTA GGT AAT GCA GAA GCA ACG GAA AGC TTA ACT 1862
 met lys ser ala ile ala leu ser leu gly gln leu gly asn ala glu ala thr glu ser leu thr
 ATG CTG TCA ACA GAT ACA GAT GAA CTT GTT CGA GTC CAT GCG ATC GCT GCA CTG ACA AAA TTA GCG 1928
 met leu ser thr asp thr asp glu leu val arg val his ala ile ala ala leu thr lys leu ala
 TAT CTT TGA AAACCGACACTGGGATCAAATCAGAAATAACAGCAGTGCATA 1980
 tyr leu OPA

Mediante experimentos de "Northern" se analizó la expresión de la *orf136* y de la *orf398*, utilizándose RNAs de células cultivadas con amonio sin inducir o inducidas en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado (Fig. 17). En ambos casos se

obtuvo un patrón de expresión similar, consistente en una mayor expresión en medio con nitrato que en medios con amonio o sin fuente de nitrógeno combinado. La expresión en medio sin nitrógeno combinado era a su vez mayor que la observada en cultivos con amonio, aunque aún en éstos había una expresión significativa. Estos datos apoyaban una posible cotranscripción de ambas *orfs*.

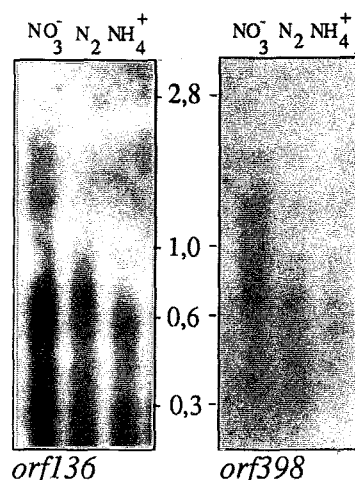


Figura 17. Estudio de la expresión de la *orf136* y de la *orf398*, mediante análisis de "Northern".

El RNA utilizado procedía de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado e incubadas en éstos durante 3 h. Los fragmentos de DNA utilizados como sonda fueron los señalados como (a) y (b) en la Fig. 20, para la *orf136* y la *orf398*, respectivamente. En el centro se indica la posición y longitud (en kb) de algunos patrones de tamaño.

Mediante experimentos de elongación del cebador, se determinó el inicio de transcripción de la *orf136* (Fig. 18), utilizándose para ello RNAs de cultivos con amonio sin inducir o inducidos durante 3 h en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado. Como cebador se utilizó el oligonucleótido nir-14 (apdo. 2.7.2), complementario a una secuencia situada a -45, con respecto al primer codón de la *orf136*.

Se observó un posible inicio de transcripción, situado a 144 pb del ATG de *orf136* (ver Fig. 16), que se usaba en todas las condiciones ensayadas, si bien el nivel del transcrito correspondiente era mayor en cultivos con nitrato que en cultivos sin fuente de nitrógeno combinado; y en estos últimos mayor que en cultivos con amonio. Así pues, existía una buena correlación entre el uso del inicio de transcripción determinado y los niveles de RNAm observados en los experimentos de "Northern" (Fig. 17). Dicho inicio de transcripción estaba precedido por cajas -10 y -35 con un

grado aceptable de similitud (especialmente el de la caja -10) con las del consenso los promotores de *E. coli* reconocidos por la RNA polimerasa con el factor σ^{70} (Fig. 16).

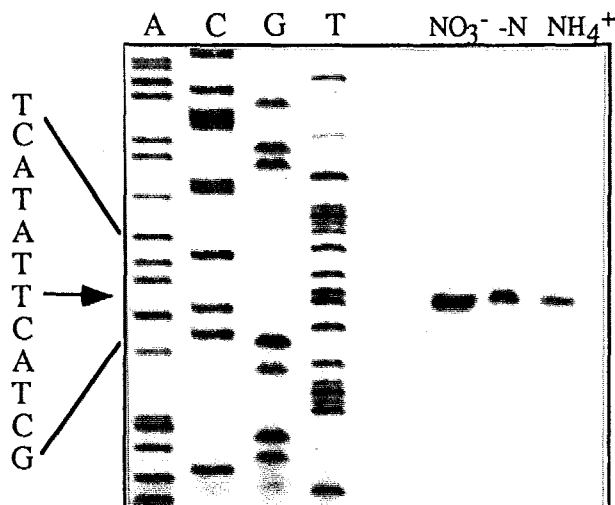


Figura 18. Determinación del inicio de transcripción de la *orf136*.

RNA total (50 μ g), aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas durante 3 h en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado, se incubó en presencia del oligonucleótido *nir-14* (apdo 2.7.2) en experimentos de elongación del cebador. Los carriles A, C, G y T contienen una escalera de secuenciación obtenida por el método de Sanger, utilizando el mismo oligonucleótido como cebador. A la izquierda se señala la secuencia de la zona que contiene el sitio de parada de la retrotranscripción (señalado con una flecha).

Para estudiar si las ORFs *orf136* y *orf398* estaban implicadas en la asimilación de nitrato se construyeron versiones mutadas de las mismas, mediante inserción de la casete C.S3 (que porta terminadores de la transcripción y proporciona resistencia a estreptomycin y espectinomycin, Elhai y Wolk, 1988a) en los sitios *Bgl*I y *Pvu*II internos a *orf136* y *orf398*, respectivamente (Fig. 16). Los plásmidos pCSE78B (*orf136*::C.S3) y pCSE81B (*orf398*::C.S3) (ver Fig. 19) se transfirieron mediante conjugación a *Anabaena* sp. PCC 7120. La sucesión de medios utilizada en ambos casos fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG110A + Sm+Sp.

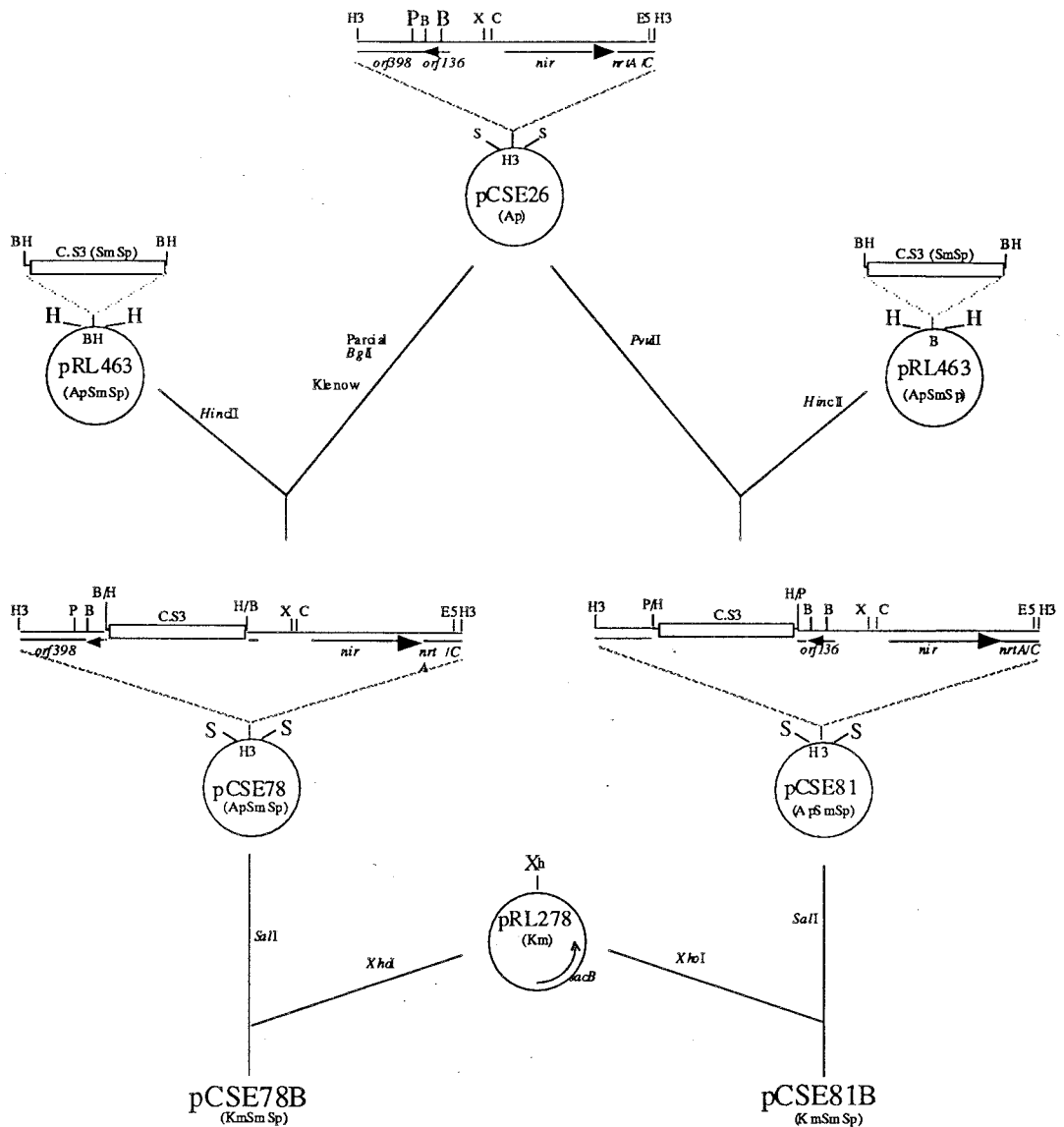


Figura 19. Esquema de la construcción de los plásmidos pCSE78B y pCSE81B usados para la generación de las estirpes CSE16 y CSE17, respectivamente.

La casete de resistencia a Sm y Sp, C.S3 (Elhai y Wolk, 1988a), limitada por sitios *HincII*, se ligó al plásmido pCSE26 (ver Fig. 15), linearizado en su único sitio *PvuII* o parcialmente digerido con *BglI* (y relleno con enzima Klenow) para generar los plásmidos pCSE81 y pCSE78, respectivamente. La diana *PvuII* de pCSE26 está dentro de la *orf398* y una de las dianas *BglI* dentro de la *orf136* (la inserción correcta de la casete C.S3 en la diana *BglI* de la *orf136* se analizó por restricción). Los insertos de pCSE81 y pCSE78, limitados por sitios *SalI*, se ligaron a pRL278, linearizado en su único sitio *XhoI*, para generar los plásmidos pCSE81B y pCSE78B, respectivamente. Abreviaturas: H3, *HindIII*; P, *PvuII*; B, *BglI*; X, *XbaI*; C, *ClaI*; E5, *EcoRV*; S, *SalI*; Xh, *XhoI*; D, *DraI*; H, *HincII*.

La estructura genómica de un clon resultante de cada conjugación, que había incorporado la construcción correspondiente mediante doble recombinación (fenotipo $Sm^rSp^rNm^sSac^r$), se determinó mediante análisis de Southern. En cada caso, la versión silvestre de *orf136* o de *orf398* (fragmento *ClaI* de 2,5 kb) había sido sustituida por la versión mutada de la correspondiente *orf* (fragmento *ClaI* de 4,5 kb) (Fig. 20). A las

estirpes que portaban las construcciones *orf136::C.S3* y *orf398::C.S3* se las denominó CSE16 y CSE17, respectivamente.

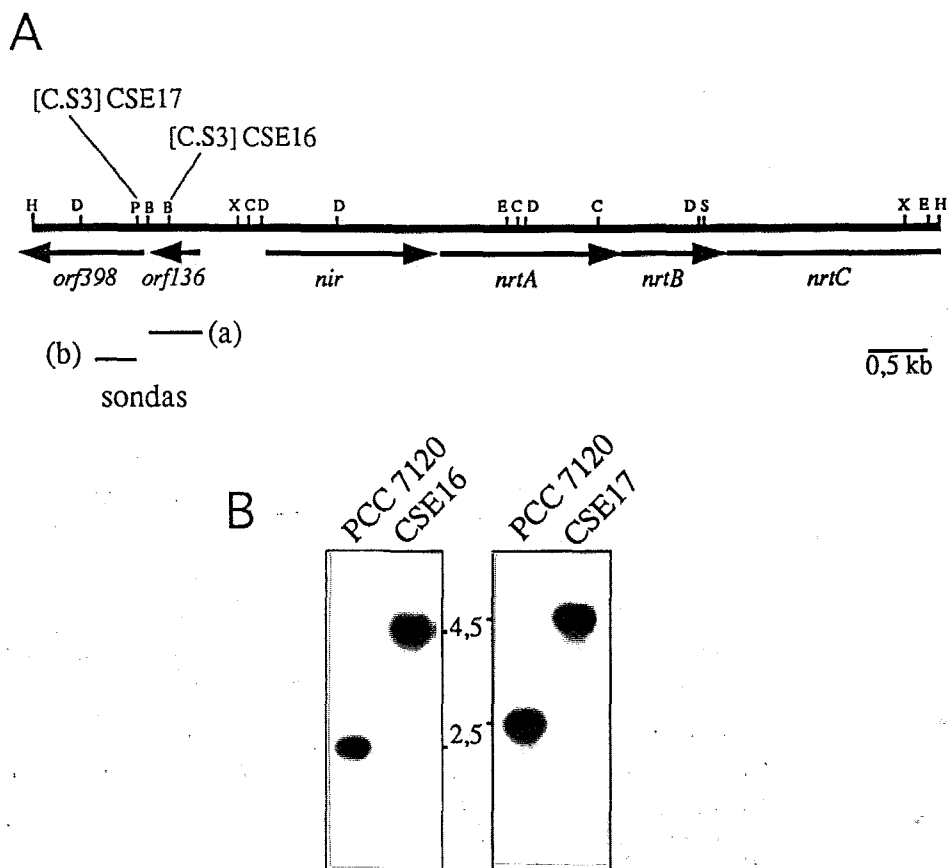


Figura 20. Análisis de la estructura genómica de las estirpes CSE16 y CSE17.

(A) Estructura de la parte del operón de asimilación de nitrato contenida en pCSE5 y disposición de las dianas *BglI* y *PvuII* en las que se insertó la casete C.S3 para la generación de las estirpes CSE16 y CSE17, respectivamente. Se indican los fragmentos de DNA usados como sonda en el análisis de Southern de las estirpes CSE16 -sonda (a)- y CSE17 -sonda (b)- mostrado en la Fig. 20B.

(B) Análisis de Southern de la estructura cromosómica de las estirpes mutantes CSE16 y CSE17 en la región genómica de asimilación de nitrato. El DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes CSE16 y CSE17 se digirió con *ClaI* y se sometió a análisis de Southern usando las sondas indicadas en cada caso. Entre los dos paneles se muestran los tamaños (en kb) de los fragmentos de DNA detectados en la estirpe silvestre y en las estirpes mutantes.

Se analizaron los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes CSE16 y CSE17. Tanto CSE16 como CSE17 mostraban niveles de ambas actividades enzimáticas comparables a los de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 7).

Así pues, se podía concluir que ni la *orf136* y ni la *orf398* se requerían para la expresión del sistema de asimilación de nitrato, al menos en nuestras condiciones de cultivo.

Tabla 7. Actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa de las estirpes mutantes CSE16 y CSE17.

Células de las estirpes que se indican cultivadas con amonio se lavaron y se resuspendieron en los medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. Tras incubar en condiciones de cultivo durante 5 horas, se determinaron las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Estirpe	Nitrato reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)			Nitrito reductasa (mU·mg de proteína ⁻¹)		
	Fuente de nitrógeno			Fuente de nitrógeno		
	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺
PCC 7120	58,9	22,0	3,0	8,5	2,7	0,1
CSE16	52,8	27,8	1,6	9,1	3,9	0,1
CSE17	69,1	38,3	1,9	4,1	2,7	0

3.2. DISTRIBUCION DEL GEN *ntcA* EN LAS CIANOBACTERIAS.3.2.1. Clonación y secuenciación de los genes *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120.

En vista del importante papel regulador de la expresión de genes de asimilación de nitrógeno que tiene la proteína NtcA en *Synechococcus* sp. PCC 7942, se planteó el objetivo de averiguar si el gen *ntcA* se encontraba ampliamente distribuido entre las cianobacterias.

Se procedió a la clonación del gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. En experimentos de Southern con DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803, digerido con diversos enzimas de restricción, en los que se usaba un fragmento *RsaI-HindIII* de 634 pb del gen *ntcA* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 como sonda, se observaron bandas de hibridación que indicaban la presencia del gen *ntcA* en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Utilizando una genoteca de *Synechocystis* sp. PCC 6803 construida en el vector lambda-ZAP II se obtuvo un clon que hibridaba con la sonda del gen *ntcA* de *Synechococcus* sp. Este clon presentaba un inserto de 6,3 kb que contenía un fragmento *BamHI-RsaI* de 0,5 kb que específicamente hibridaba con la sonda de *Synechococcus* sp. (Fig. 21). La secuenciación del DNA en esta región permitió identificar una ORF de 225 aminoácidos delante de la cual había un posible sitio de unión al ribosoma (Fig. 22). El polipéptido deducido de esta ORF mostraba un 79% de aminoácidos idénticos con la proteína NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Véase la Fig. 25 más adelante).

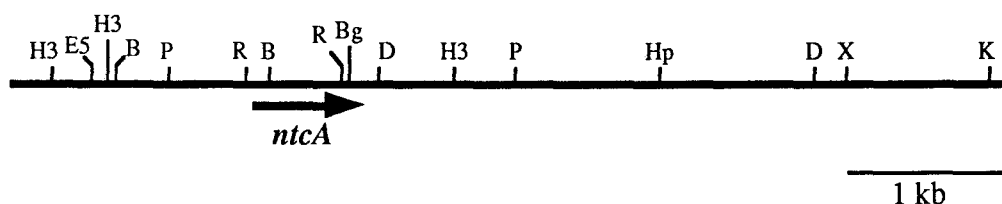


Figura 21. Mapa de restricción de la región del genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que contiene al gen *ntcA*.

Abreviaturas: H3, *HindIII*; P, *PstI*; E5, *EcoRV*; X, *XbaI*; D, *DraI*; R, *RsaI*; B, *BamHI*; Bg, *BglII*; Hp, *HpaI*; K, *KpnI*.

1
 ATTTATCAGTGTGCCTATCAGA

23
 AATATTCAGGGCGAGTACATGGTGGTGCACCCCTCGGCGATCGTTGCCATTCGGGTGGAACCAATTTTCTTTGGCAGTG
 102
 TGGAGCGCATGTAATCCGTTGTGTATAATCTTGATACAGAATGGGGTTTTGCACTTCCCTTGATGCCCCCATTACCGTG
 181
AACGTGC ATG GAT CAG TCC CTA ACC CAA GAT CGT CCC CTA GCG GCA GTG TTT CGA CGC TTA
 met asp gln ser leu thr gln asp arg pro leu ala ala val phe arg arg leu
 242
 GGC AGT GAG TTG ATG CCC CCG GTG GTG GAA ACG TTT GAT CGG AGT AAA ACA ATT TTT TTT
 gly ser glu leu met pro pro val val glu thr phe asp arg ser lys thr ile phe phe
 302 BamHI
 CCT GGG GAT CCG GCG GAA CGG GTT TAT TTT TTG CTC AAG GGG GCT GTT AAG TTA TCT AGG
 pro gly asp pro ala glu arg val tyr phe leu leu lys gly ala val lys leu ser arg
 362
 GTT TAC GAA GCC GGG GAA GAA ATT ACC GTC GCT CTG TTG AGG GAG AAC AGT GTT TTT GGG
 val tyr glu ala gly glu glu ile thr val ala leu leu arg glu asn ser val phe gly
 422
 GTG TTA TCA TTA GTT ACC GGG CAA CGT TCT GAC CGT TTT TAC CAC GCA GTG GCT TTT ACC
 val leu ser leu val thr gly gln arg ser asp arg phe tyr his ala val ala phe thr
 482
 CCG GTG GAG TTA CTG TCT GCC CCC ATT GAA CAG GTG GAA CAG GCT CTC AAG GAG CAT CCC
 pro val glu leu leu ser ala pro ile glu gln val glu gln ala leu lys glu his pro
 542
 GAC CTG TCA TTG TTG ATG TTA CAG GGG CTT TCT TCC CGC ATT CTC CAG ACG GAA ATG ATG
 asp leu ser leu leu met leu gln gly leu ser ser arg ile leu gln thr glu met met
 602
 ATT GAA ACC CTA GCC CAC CGG GAT ATG GGT TCT CGT TTG GTT AGT TTT TTG CTG ATT CTC
 ile glu thr leu ala his arg asp met gly ser arg leu val ser phe leu leu ile leu
 662
 TGT CGA GAT TTT GGT GTA CCT GCC CCG GAC GGC ATT CGC ATT GAC CTC AAG TTA TCC CAT
 cys arg asp phe gly val pro ala pro asp gly ile arg ile asp leu lys leu ser his
 722 BglIII
 CAG GCG ATC GCC GAA GCC ATT GGT TCC ACC AGG GTA ACG GTG ACT AGG CTC CTA GGA GAT
 gln ala ile ala glu ala ile gly ser thr arg val thr val thr arg leu leu gly asp
 782
 CTG CGG GAG GGT AAT ATG ATC TCC ATC ACG AAA AAG AAA ATT ACC GTC CAT AAC CCC GTT
 leu arg glu gly asn met ile ser ile thr lys lys lys ile thr val his asn pro val
 842
 GCT CTC AGT CAA CAG TTT ACC TAA CCA CCC TCT ATG ACC AGT GCC TAT ATT
 ala leu ser gln gln phe thr OCR

Figura 22. Secuencia de nucleótidos de la región del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que contiene al gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

Se señala subrayado un posible sitio de unión al ribosoma, así como las dianas *Bam*HI y *Bgl*III mencionadas en el texto. Esta secuencia está depositada en el banco de datos con el número de acceso X71607.

Por otra parte, usando como sonda un fragmento *Bam*HI-*Bgl*III de 471 pb interno al gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ver Fig. 21 y 22) se observaron bandas de hibridación en experimentos de Southern con DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 digerido con diversas enzimas de restricción. Para el intento de clonación del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se preparó una subgenoteca de los fragmentos de aproximadamente 3,5-4 kb del DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 digerido con *Cla*I, utilizando como vector pIC-20R (Materiales y

métodos, apdo. 2.6). Los clones de la subgenoteca de fragmentos *ClaI* se agruparon en 18 grupos de 24 clones cada uno de ellos. Se analizaron mezclas de plásmidos de cada uno de los grupos mediante Southern usando la misma sonda de *Synechocystis* sp. PCC 6803 empleada para hibridar con el DNA total de *Anabaena* sp. Se obtuvo una fuerte señal de hibridación con 4 de estos grupos. El análisis de los clones contenidos en uno de ellos permitió distinguir un clon, pCSE4a, que hibridaba fuertemente. La zona responsable de la hibridación se localizaba en uno de los extremos del inserto (Fig. 23). La secuenciación de dicho extremo mostró la presencia de parte de una ORF cuya secuencia de aminoácidos era similar a la del extremo C-terminal de las proteínas NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803. Para intentar clonar dicha ORF completa, se preparó una subgenoteca de fragmentos *HindIII* (de aproximadamente 5 kb) de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120, utilizando el vector pRL500 (ver apdo 2.6). Los clones de esta subgenoteca se analizaron individualmente (ver apdo 2.6) mediante hibridación con un fragmento *ClaI-EcoRI* de 338 pb de pCSE4a (ver Fig. 23) que contenía parte de la ORF identificada en este plásmido. Se obtuvo un clon, pCSE4, que contenía el gen *ntcA* completo (Fig. 23). Mediante secuenciación (Fig. 24) se pudo identificar una ORF que cifrará un polipéptido de 223 aminoácidos, cuya secuencia mostraba un 77 y un 86% de residuos idénticos con los de las proteínas NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, respectivamente (Fig. 25). Al igual que las proteínas de *Synechococcus* sp. y *Synechocystis* sp., la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 presentaba en su extremo C-terminal un posible dominio hélice-giro-hélice de unión al DNA. Este dominio es idéntico en las tres proteínas.

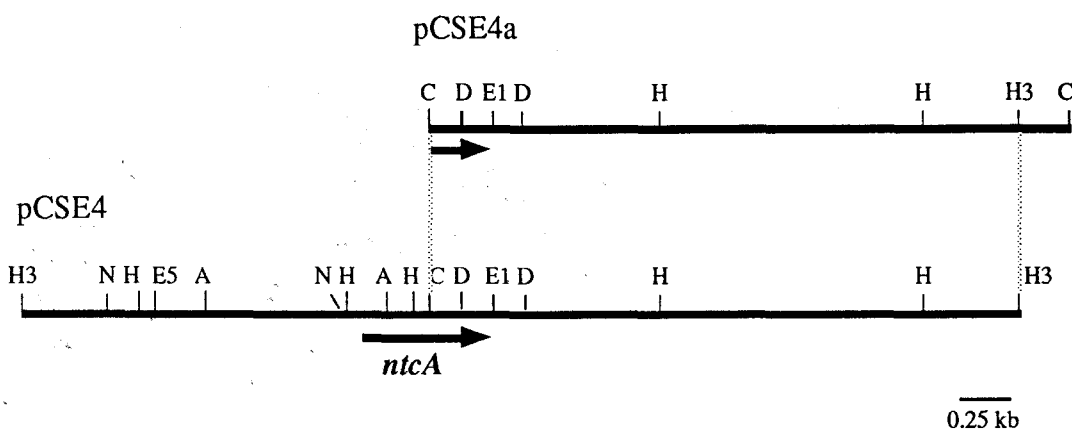


Figura 23. Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSE4a y pCSE4, que contienen el gen *ntcA*, o parte del mismo, de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Abreviaturas: H3, *HindIII*; N, *NheI*; H, *HincII*; E5, *EcoRV*; A, *AccI*; C, *ClaI*; D, *DraI*; E1, *EcoRI*.

```

1
GTTAACGGTGC TTTATTGATTTTTTCAGGTGTATTCTTAGGTAATTAGTTTT
52
TAGTTTTTTTGT TATTCCGGCATTGGGTAGGGGAAGGGGAG ATG ATC GTG ACA CAA GAT AAG GCC CTA GCA
                —— met ile val thr gln asp lys ala leu ala
121
AAT GTT TTT CGT CAG ATG GCA ACC GGA GCT TTT CCT CCT GTT GTC GAA ACG TTT GAA CGC
asn val phe arg gln met ala thr gly ala phe pro pro val val glu thr phe glu arg
181
AAT AAA ACG ATC TTT TTT CCT GGC GAT CCT GCC GAA CGA GTC TAC TTT CTT TTG AAA GGG
asn lys thr ile phe phe pro gly asp pro ala glu arg val tyr phe leu leu lys gly
241
GCT GTG AAA CTT TCC AGG GTG TAC GAG GCA GGA GAA GAG ATT ACA GTA GCA CTA CTA CGG
ala val lys leu ser arg val tyr glu ala gly glu glu ile thr val ala leu leu arg
301
GAA AAT AGC GTT TTT GGT GTC CTG TCT TTG TTG ACA GGA AAC AAG TCG GAT AGG TTT TAC
glu asn ser val phe gly val leu ser leu leu thr gly asn lys ser asp arg phe tyr
361
CAT GCG GTG GCA TTT ACT CCA GTA GAA TTG CTT TCT GCA CCA ATT GAA CAA GTG GAG CAA
his ala val ala phe thr pro val glu leu leu ser ala pro ile glu gln val glu gln
421
                    ClaI
GCA CTG AAG GAA AAT CCT GAA TTA TCG ATG TTG ATG CTG CGG GGT CTG TCT TCG CGG ATT
ala leu lys glu asn pro glu leu ser met leu met leu arg gly leu ser ser arg ile
481
CTA CAA ACA GAG ATG ATG ATT GAA ACC TTA GCG CAC CGA GAT ATG GGT TCG AGA TTG GTG
leu gln thr glu met met ile glu thr leu ala his arg asp met gly ser arg leu val
541
AGT TTT CTG TTA ATT CTC TGT CGT GAT TTT GGT GTT CCT TGT GCA GAT GGA ATC ACA ATT
ser phe leu leu ile leu cys arg asp phe gly val pro cys ala asp gly ile thr ile
601
GAT TTA AAG TTA TCT CAT CAG GCG ATC GCC GAA GCA ATT GGC TCT ACT CGC GTT ACT GTT
asp leu lys leu ser his gln ala ile ala glu ala ile gly ser thr arg val thr val
661
ACT AGG CTA CTA GGG GAT TTG CGG GAG AAA AAG ATG ATT TCC ATC CAC AAA AAG AAG ATT
thr arg leu leu gly asp leu arg glu lys lys met ile ser ile his lys lys lys ile
721
                    EcoRI
ACT GTG CAT AAA CCT GTG ACT CTC AGC AGA CAG TTC ACT TAAAGAAGAATAGCAGGAGTCAGAATTC
thr val his lys pro val thr leu ser arg gln phe thr OCR

```

Figura 24. Secuencia de nucleótidos de la región del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene al gen *ntcA* y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

Se señalan 2 posibles sitios de unión al ribosoma (subrayados) y los sitios *ClaI* (usado para la generación de la estirpe mutante CSE2; apdo. 3.3.1) y *EcoRI* (usado para generar la estirpe CSE5; apdo 3.3.6). Esta secuencia está depositada en el banco de datos con el número de acceso X71608.

3.2.2. Posible presencia del gen *ntcA* en otras cianobacterias.

Dada la similitud de secuencia entre las proteínas deducidas de los tres genes *ntcA* secuenciados (Fig. 25), pertenecientes a cianobacterias muy diferentes, existía la posibilidad de que el gen *ntcA* estuviera ampliamente distribuido entre estos organismos. Para ensayar tal posibilidad se estudió, mediante análisis de Southern, la presencia de secuencias homólogas al gen *ntcA* en los genomas de otras cianobacterias.

```

*   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
NtcA_6803 ( 1) MDQSLTQDRPLAAVFRRLGSELMPVVFETFDRSKTIFFPGDPAERVYFLL
NtcA_7120 ( 1)  MIVTQDKALANVFRQMATGAFPPVVFETFERNKTIFFPGDPAERVYFLL
NtcA_7942 ( 1)  MLANENSLTMTFRELGSGKLPQLQIEQFERGKTIFFPGDPAERVYLLV

*****
NtcA_6803 ( 51) KGAVKLSRVYEAGEEITVALLRENSVFGVLSLVTGQRSDRFYHAVAFTPV
NtcA_7120 ( 49) KGAVKLSRVYEAGEEITVALLRENSVFGVLSLLTGNKSDRFYHAVAFTPV
NtcA_7942 ( 48) KGAVKLSRVYESGEEITVALLRENSVFGVLSLLTGQRSDRFYHAVAFTPV

* * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *
NtcA_6803 (101) ELLSAPIEQVEQALKEHPDLSLLMLQGLSSRILQTEMMIETLAHRDMGSR
NtcA_7120 ( 99) ELLSAPIEQVEQALKENPELSMLMLRGLSSRILQTEMMIETLAHRDMGSR
NtcA_7942 ( 98) QLFSVPIEFMQKALIERPELANVLMQGLSSRILQTEMMIETLAHRDMGSR

*****
NtcA_6803 (151) LVSFLLILCRDFGVPAPDGIKIDKLSHQAI AEAIGSTRVTVTRLLGDLR
NtcA_7120 (149) LVSFLLILCRDFGVP CADGITIDKLSHQAI AEAIGSTRVTVTRLLGDLR
NtcA_7942 (148) LVSFLLILCRDFGIPSPDGITIDKLSHQAI AEAIGSTRVTVTRLLGDLR

*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
NtcA_6803 (201) EGNMISITKKKITVHNPAVALSQQFT (225)
NtcA_7120 (199) EKKMISIHKKKITVHKPVTLSRQFT (223)
NtcA_7942 (198) ESKLIAIHKKRITVFNPAVALSQQFS (222)

```

Figura 25. Comparación de las secuencias de los productos de los genes *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Synechococcus* sp. PCC 7942.

La comparación se llevó a cabo mediante el programa PILEUP contenido en el paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984). Los residuos conservados entre las 3 proteínas se señalan con *. El motivo hélice-giro-hélice de unión al DNA se indica subrayado.

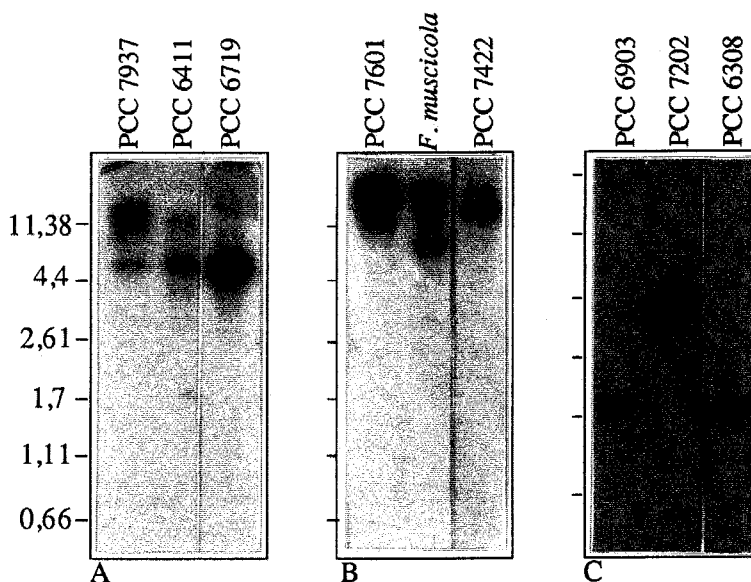


Figura 26. Presencia de secuencias de DNA homólogas al gen *ntcA* en otras cianobacterias.

Se llevaron a cabo análisis de Southern usando DNA genómico de las cianobacterias que se indican digerido con *Hind*III (paneles A y B y estirpe PCC 6903 en el panel C) o con *Dra*I (estirpes PCC 7202 y PCC 6308 en el panel C), utilizando como sonda el fragmento *Cl*aI-*Eco*RI (338 pb) del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (paneles A y B) o el fragmento *B*aMHI-*B*gI III interno al gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Las hibridaciones se realizaron en condiciones de alta estringencia (panel A) o de baja estringencia (paneles B y C) (ver Materiales y métodos, Apdo. 2.4.5). Se indican las posiciones y longitud (en kb) de algunos marcadores de tamaño.

Así, usando como sonda el fragmento *ClaI-EcoRI* de 338 pb (ver Fig. 24) del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se obtuvo señal de hibridación con DNAs genómicos de las cianobacterias *Anabaena* sp. PCC 7937 (*Anabaena variabilis*), *Anabaena* sp. PCC 6411, *Nostoc* sp. PCC 6719, *Calothrix* sp. PCC 7601, *Fischerella muscicola* UTEX 1829 y *Nostoc* sp. PCC 7422 (Fig. 26, paneles A y B). Por otra parte, usando como sonda el fragmento *BamHI-BglIII* de 471 pb (ver Fig. 22) del gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se obtuvo señal de hibridación con los DNAs genómicos de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, *Synechococcus* sp. PCC 7202 y *Synechocystis* sp. PCC 6308 (Fig. 26, panel C). En resumen, se obtuvieron resultados positivos de hibridación con DNAs genómicos de otras nueve cianobacterias representantes de diversos grupos taxonómicos, lo que sugiere una distribución general del gen *ntcA* en las cianobacterias.

3.3. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *ntcA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

Dado que la metodología genética se encuentra ampliamente desarrollada en *Anabaena* sp. PCC 7120, se decidió abordar el estudio del papel de *ntcA* en esta cianobacteria con objeto de averiguar si este gen está implicado en los procesos de asimilación del dinitrógeno y del desarrollo de los heterocistos. Para ello, se generó un mutante *ntcA*⁻ de esta cianobacteria.

3.3.1. Generación de un mutante del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

El plásmido pCSE35 (Fig. 27) que porta una versión mutada de *ntcA* generada mediante la inserción, en el sitio *ClaI* interno al gen, de una casete de resistencia a Sm y Sp, C.S3 (Elhai and Wolk, 1988a), se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación (ver Materiales y métodos, apdo. 2.3.1). En este caso, la sucesión de medios utilizada durante la conjugación fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG110A + Sm+Sp. Varios clones que mostraban resistencia a Sm, Sp y sacarosa y sensibilidad a Nm, y que, por tanto, habrían incorporado la construcción *ntcA*::C.S3 mediante doble recombinación (ver Materiales y métodos, apdo 2.3.1) se sometieron a varias rondas de cultivo líquido, sonicación para fragmentar los filamentos y aislamiento de colonias en medio selectivo, para favorecer la segregación de los cromosomas portadores de la construcción mutante. Posteriormente, se analizó la capacidad de crecimiento a expensas del nitrato en medio sólido, en presencia de Sm y Sp, de 100 de los clones obtenidos tras las varias rondas de segregación, resultando que sólo uno de ellos, estirpe CSE2, era incapaz de usar el nitrato como fuente de nitrógeno. El análisis de Southern (Fig. 28 A y B) de la estructura genómica en la región *ntcA* de dicha estirpe permitió deducir que en ella la versión silvestre de *ntcA* (fragmento *HincII* de 1,3 kb) había sido

totalmente reemplazada por la versión mutante *ntcA::C.S3* (fragmento *HincII* de 3,3 kb).

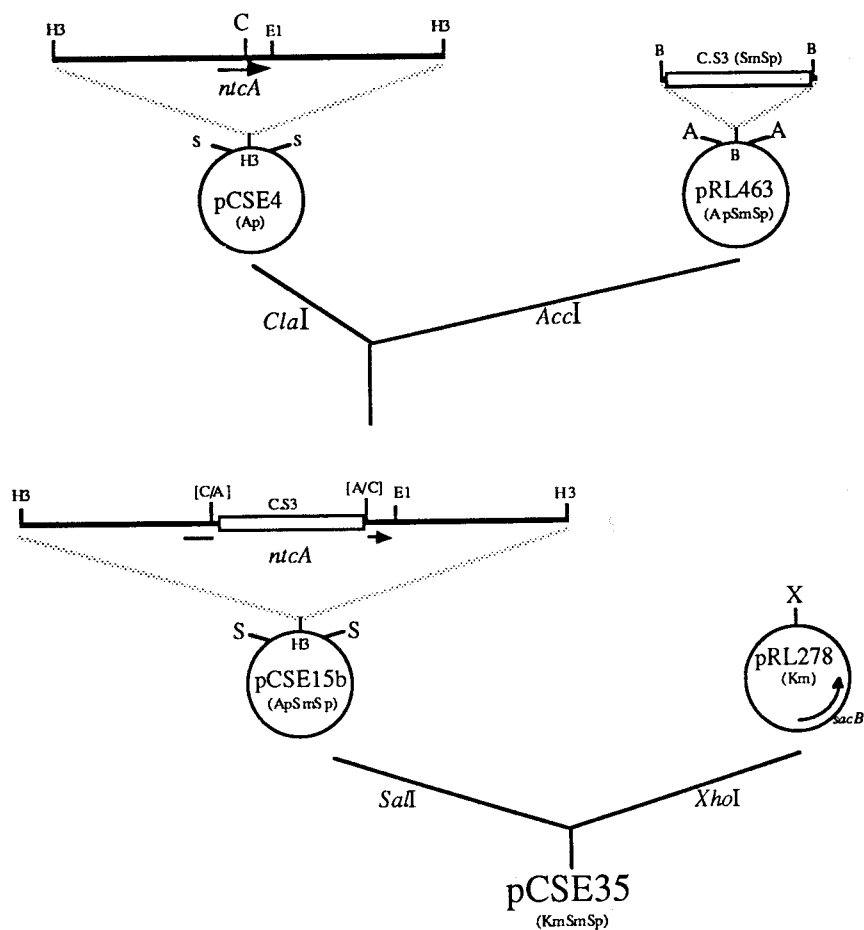


Figura 27. Esquema de la construcción del plásmido pCSE35, usado para la generación de la estirpe CSE2.

La casete C.S3, que proporciona resistencia a estreptomicina y espectinomycin (Elhai y Wolk, 1988a), delimitada por dianas *AccI*, se insertó en el único sitio de restricción *Clal*, interno al gen *ntcA*, presente en el inserto de pCSE4, originando el plásmido pCSE15b. El inserto *SalI* de este último se clonó, posteriormente, en la única diana *XhoI* de pRL278 (Cai y Wolk, 1990) originándose el plásmido pCSE35. Abreviaturas: H3, *HindIII*; A, *AccI*; C, *Clal*; E1, *EcoRI*; S, *SalI*; B, *BamHI*; X, *XhoI*.

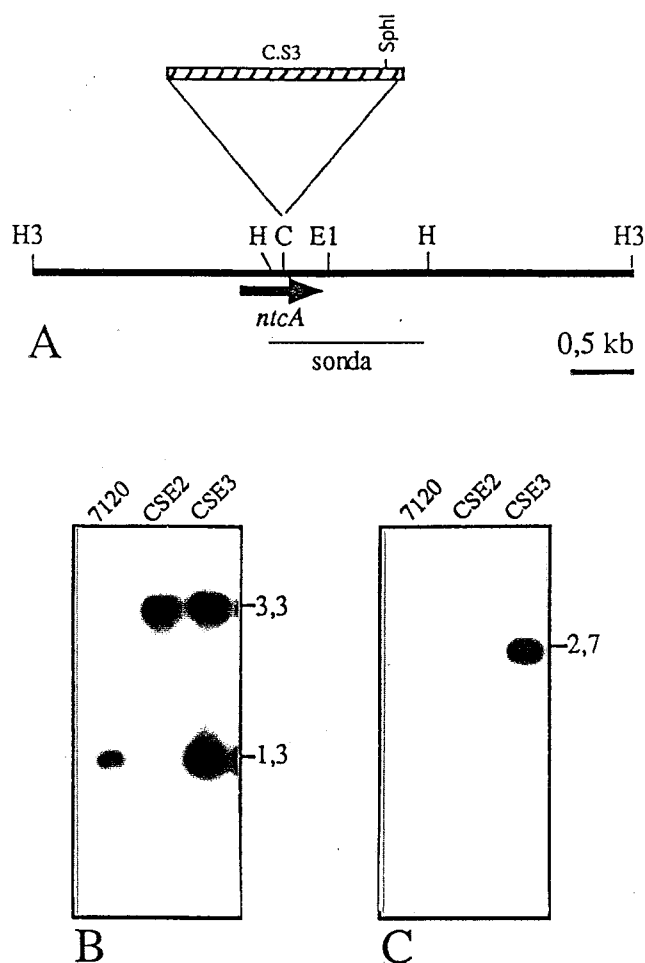


Figura 28. Análisis de la estructura genómica de la región *ntcA* de las estirpes CSE2 y CSE3.

A. El inserto de pCSE4 se muestra esquemáticamente, indicándose el sitio donde se introdujo el casete C.S3 para la generación del mutante CSE2. Además se señala el fragmento de DNA usado como sonda en el análisis de las estirpes CSE2 y CSE3 (mostrado en la Fig. 28B).

B y C. Análisis de Southern de la estructura genómica de la región *ntcA* de las estirpes CSE2 y CSE3 (que se describirá más adelante en el texto). DNA genómico digerido con *HincII* se sometió a hibridación con el fragmento anteriormente indicado (B) o con el plásmido pRL500 (C). Se indican los tamaños (en kb) de los fragmentos de DNA detectados.

3.3.2. Crecimiento del mutante CSE2 con diversas fuentes de nitrógeno.

Se examinó la capacidad de la estirpe mutante CSE2 de crecer en medio líquido usando amonio, nitrato o dinitrógeno como única fuente de nitrógeno (Fig. 29). En contraste con la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 capaz de crecer en los medios ensayados, la estirpe mutante CSE2 era incapaz de crecer a expensas de nitrato o de

dinitrógeno, mientras que crecía a una tasa similar a la del silvestre en medios que contenían amonio como fuente de nitrógeno.

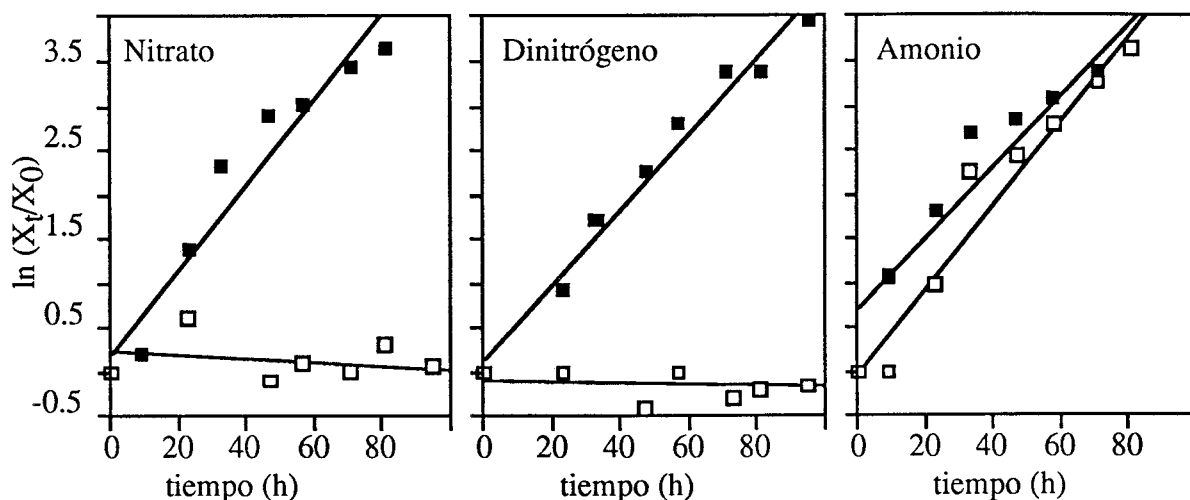


Figura 29. Crecimiento de la estirpe mutante CSE2 en medio con nitrato, sin fuente de nitrógeno combinado o con amonio.

Células de *Anabaena* sp. PCC 7120 (■) y CSE2 (□) cultivadas con amonio se lavaron y se transfirieron a medios con amonio, con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado. Se inoculó a razón de $0,2 \mu\text{g}$ de clorofila· ml^{-1} , y las suspensiones celulares resultantes se incubaron en dichos medios en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada cultivo para la determinación de la concentración de proteína (apdo. 2.1.1.2). X_t , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo t ; X_0 , μg de proteína· ml^{-1} a tiempo cero.

3.3.3. Actividades nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa y nitrogenasa de la estirpe CSE2.

Se utilizaron células de la estirpe mutante CSE2 y de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120, cultivadas con amonio e incubadas en medios con amonio, nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado, para la medida de las actividades nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa, o cultivadas en amonio e incubadas en medio sin fuente de nitrógeno combinado para la medida de la actividad nitrogenasa (Tabla 8). A diferencia de los altos niveles tanto de nitrato reductasa como de nitrito reductasa que se encontraban en la estirpe silvestre en medios conteniendo nitrato, la estirpe mutante exhibía bajos niveles de actividad de ambas enzimas en medio con nitrato. Asimismo, mientras la estirpe silvestre presentaba actividad nitrogenasa en medio sin nitrógeno combinado, la estirpe CSE2 presentaba niveles prácticamente indetectables de dicha actividad (Tabla 8). El nivel de actividad glutamina sintetasa era también inferior en la estirpe mutante que en la estirpe silvestre en todas las condiciones de cultivo ensayadas. Tampoco se observaba en la estirpe CSE2 el característico



aumento de actividad glutamina sintetasa que tiene lugar en la estirpe silvestre tras la eliminación del amonio del medio de cultivo (Tabla 8). Así pues, el mutante CSE2 era incapaz de desreprimir la nitrato reductasa, la nitrito reductasa, la glutamina sintetasa y la nitrogenasa cuando se eliminaba el amonio del medio de cultivo.

Tabla 8. Niveles de actividad de algunos enzimas implicados en la asimilación de nitrógeno en la estirpe mutante CSE2.

Células de *Anabaena* sp. PCC 7120 o de CSE2 cultivadas con amonio se lavaron y se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno indicada, en los que se incubaron en condiciones de cultivo. Tras 5 h (nitrato reductasa y nitrito reductasa), 23 h (glutamina sintetasa) o 48 h (nitrogenasa) se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades enzimáticas. Las actividades enzimáticas se expresan como $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. ND: No determinado.

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa		Nitrito reductasa		Nitrogenasa		Glutamina sintetasa	
	PCC 7120	CSE2	PCC 7120	CSE2	PCC 7120	CSE2	PCC 7120	CSE2
Nitrato	55,6	3,20	29,5	<0,1	ND	ND	948	228
Dinitrógeno	ND	ND	ND	ND	2,10	<0,01	897	157
Amonio	9,20	<0,1	1,20	<0,1	0,05	ND	544	262

3.3.4. Expresión de los genes *nir*, *glnA* y *nif* en la estirpe CSE2.

Se analizó, mediante experimentos de "Northern", la acumulación de los RNA mensajeros del operón *nir* (de asimilación de nitrato), del operón *nifHDK* (que cifra la nitrogenasa) y del gen *glnA* (que cifra la glutamina sintetasa) tanto en la estirpe mutante CSE2 como en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Fig. 30). En el caso del operón *nir*, se obtuvo hibridación, en forma de una señal dispersa que abarcaba RNAs de entre 0,3 y 5,3 kb, con RNA de cultivos con nitrato de *Anabaena* sp. PCC 7120, pero no con los RNA de cultivos de CSE2 (Fig. 30). Por otra parte, en el caso del operón *nifHDK*, sólo después de 24 h de inducción en medio sin nitrógeno, se detectaron transcritos de 4,7 kb (que han de englobar a *nifHDK*) y de 2,6 kb (que corresponderían a *nifHD*) en la estirpe silvestre, pero no en la mutante (Fig. 30). Por último, la cantidad de RNA que hibridaba con la sonda de *glnA* en la estirpe silvestre era muy superior en medios sin amonio que en medios con amonio; la banda mayor de hibridación obtenida era de aproximadamente 1,44 kb y podría corresponder al gen *glnA* completo (de 1425 pb de longitud) (Fig. 30). En la estirpe CSE2 se encontraron muy bajos niveles de dicho RNAm en cualquiera de las condiciones analizadas. Así pues, los bajos niveles de actividades enzimáticas implicadas en la asimilación de nitrógeno que presentaba la estirpe CSE2 correlacionaban con niveles bajos de sus RNA mensajeros.

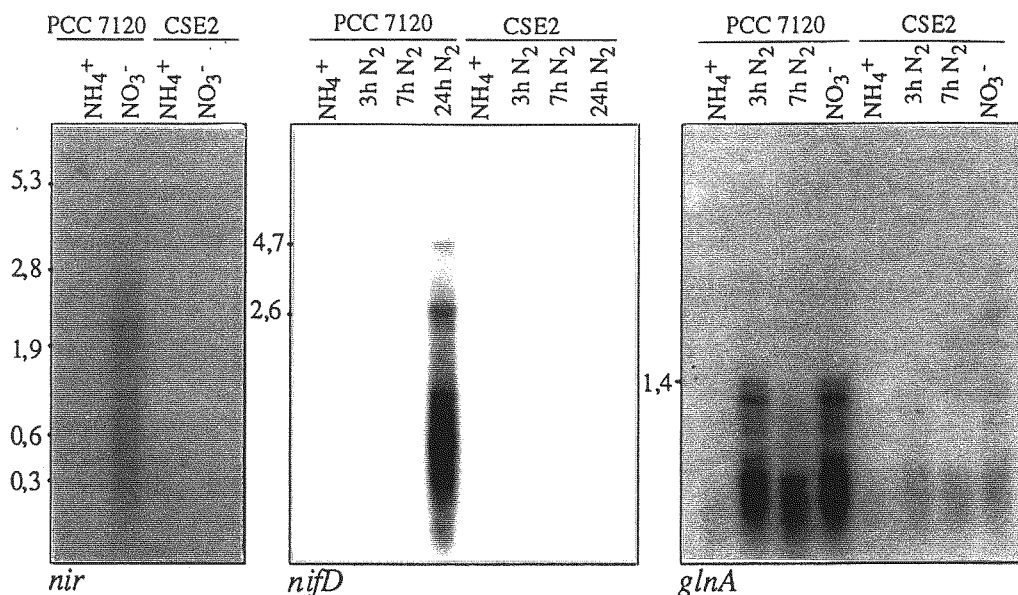


Figura 30. Análisis de "Northern" de la expresión del operón *nir*, del operón *nifHDK* y del gen *glnA* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.

Sondas utilizadas: Primer panel, fragmento *HincII* de 282 pb que comprende la porción C-terminal del gen *nir* (ver Fig. 1); segundo panel, fragmento *HindIII-EcoRI* de 1094 pb que contiene la mayor parte del gen *nifD* (Lammers y Haselkorn, 1983) y tercer panel, fragmento *EcoRI* de 484 pb de la zona N-terminal del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983). El RNA se aisló de células cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas durante 3 h en presencia de nitrato o durante 3, 7 ó 24 h en medio sin fuente de nitrógeno combinado. Se indican las posiciones y los tamaños (en kb) de las bandas más características.

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han descrito varios sitios de inicio de la transcripción para la expresión del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983). Para analizar si el bajo nivel de RNAm del gen *glnA* presente en la estirpe CSE2 se debía a la no utilización de algunos de esos inicios de transcripción, se realizaron experimentos de elongación del cebador (usando el oligonucleótido *glnA*; ver Materiales y métodos, apdo. 2.7.2) con RNAs de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la estirpe CSE2 (Fig. 31). Tumer *et al.* describieron cuatro inicios de transcripción (correspondientes a los RNA_I a RNA_{IV}) para el gen *glnA*. En nuestros experimentos, se obtuvieron otros tantos inicios de transcripción cuando se usaba RNA de *Anabaena* sp. PCC 7120, aunque sus localizaciones diferían en algunos casos de la de los descritos por Tumer *et al.* Así, mientras que nuestro RNA_I correspondía al descrito por estos autores, nuestros RNA_{II} y RNA_{IV} se localizaban 2 y 8 nucleótidos, respectivamente, delante de los ya descritos y nuestro RNA_{III} (que se refiere como RNA_{III}* en la Fig. 31) estaba 50 nucleótidos detrás del RNA_{III} descrito por Tumer *et al.* La utilización de RNA_I en la estirpe silvestre era más abundante en medio con nitrato o sin fuente de nitrógeno que en medio con amonio. Bajo las mismas condiciones, la utilización de RNA_I se encontraba muy disminuida en la estirpe CSE2.

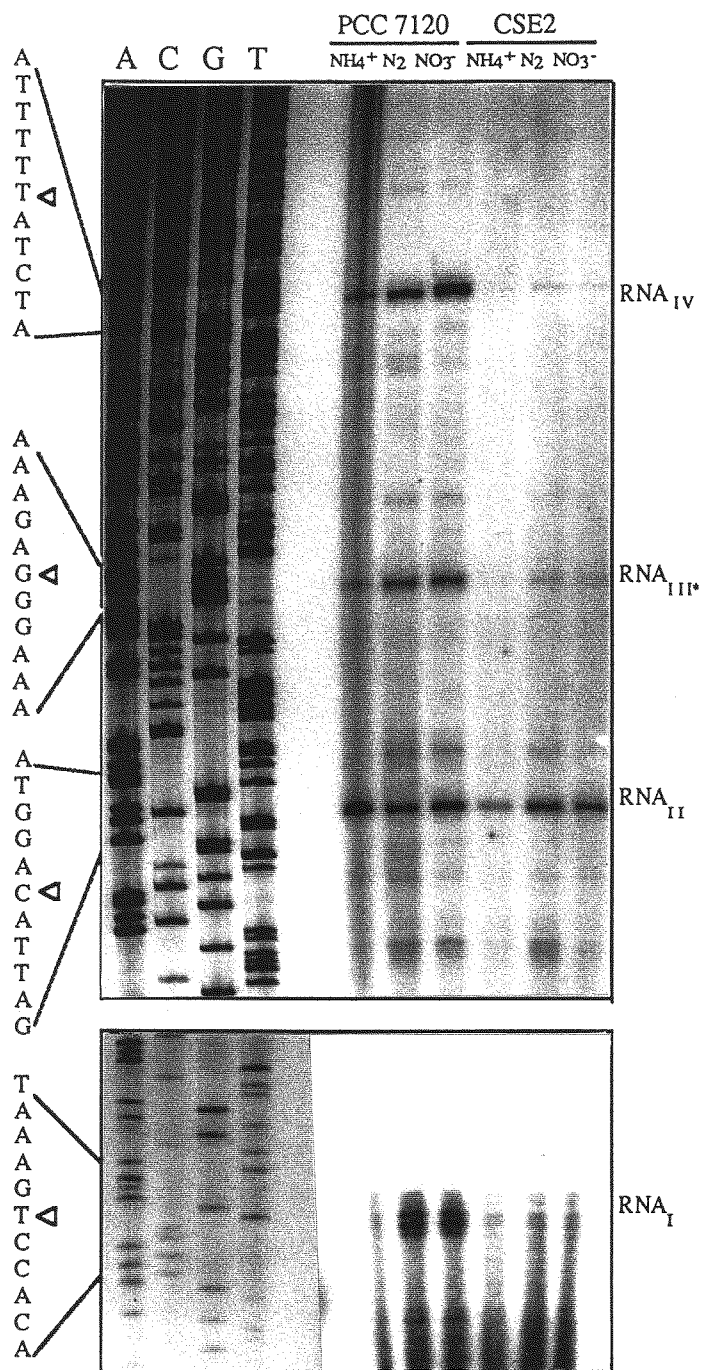


Figura 31. Determinación de los sitios de inicio de transcripción del gen *glnA* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.

Se llevaron a cabo experimentos de elongación del cebador con el oligonucleótido *glnA* (apdo. 2.7.2) y RNA total (50 µg) aislado de células cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas, durante 3 h, en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado. Los carriles A, C, G y T contienen una escalera de secuenciación obtenida por el método de Sanger, utilizando como cebador el mismo oligonucleótido. A la izquierda se muestran las secuencias que contienen los diferentes puntos de parada de retrotranscripción (señaladas con triángulos).

En contraste, la utilización de RNA_{II} tenía lugar en todas las condiciones de cultivo analizadas, tanto en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 como en la estirpe mutante CSE2. RNA_{IV} se utilizaba en la estirpe silvestre en todas las condiciones, si bien algo menos en presencia de amonio; sin embargo, se utilizaba débilmente en la estirpe mutante bajo las mismas condiciones. RNA_{III*} seguía el mismo patrón de utilización que RNA_{IV} y, por tanto, podría ser un producto de degradación de este último (Schneider *et al.*, 1991). Por consiguiente, tanto la utilización de RNA_I como de RNA_{IV} parece estar regulada por NtcA.

Por otra parte, como se describe en el apdo. 3.1.4, el operón de asimilación de nitrato presenta un sitio de inicio de transcripción que se utiliza en la estirpe silvestre en ausencia de amonio, tanto en presencia de nitrato como en ausencia de nitrógeno combinado. En la estirpe CSE2 no se observaba expresión alguna a partir de este sitio de inicio de transcripción en ninguna de las condiciones de cultivo analizadas (Fig. 32). Así pues, el sitio de inicio de la transcripción del operón *nir* regulado por amonio en *Anabaena* sp. PCC 7120 requiere la presencia de un gen *ntcA* intacto en la célula.

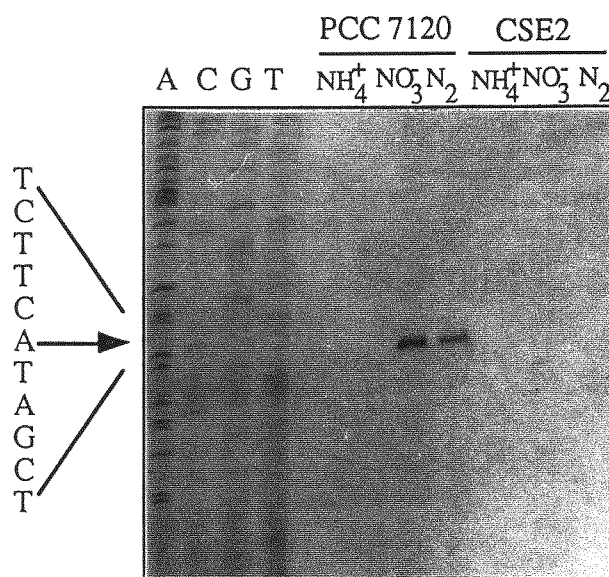
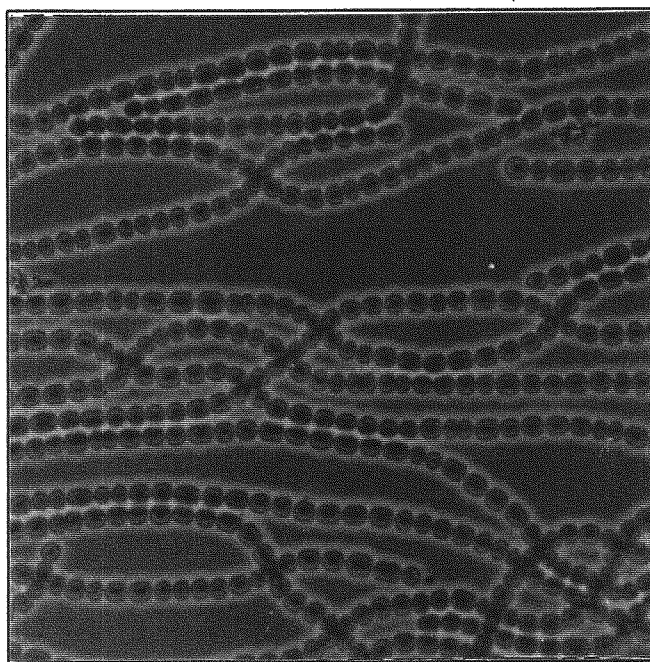
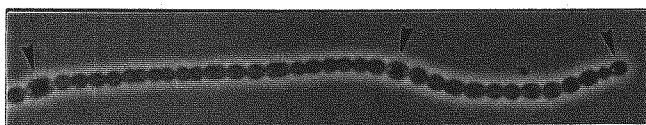


Figura 32. Determinación del inicio de transcripción del operón *nir* en la estirpe mutante CSE2.

Se llevaron a cabo experimentos de elongación de cebador con el oligonucleótido *nir-1* (apdo. 2.7.2) y RNA total (50 µg) aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 o de CSE2 cultivadas con amonio o cultivadas con nitrato e incubadas, durante 3 h, en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado. Los carriles A, C, G y T contienen una escalera de secuenciación obtenida por el método de Sanger, utilizando el mismo oligonucleótido como cebador. A la izquierda se muestra la secuencia que contiene el sitio de parada de la retrotranscripción (señalada con una flecha).



CSE2



PCC 7120

Figura 33. Fotografías al microscopio óptico de filamentos de las estirpes silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y CSE2 incubadas en medio sin nitrógeno combinado.

Células de la estirpe mutante CSE2 y de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio e incubadas durante 48 h en medio sin nitrógeno combinado se examinaron microscópicamente y se fotografiaron. Algunos heterocistos se señalan con cabezas de flechas (653 aumentos).

3.3.5. Requerimiento de *ntcA* para el desarrollo de los heterocistos.

En *Anabaena* sp., el crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico y la expresión del operón *nifHDK* en condiciones aeróbicas requiere el desarrollo de heterocistos. Se analizó microscópicamente la presencia de heterocistos en cultivos de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y del mutante CSE2 tras 48 h de incubación en medios sin fuente de nitrógeno combinado. En contraste con la situación en la estirpe silvestre que diferenciaba heterocistos maduros totalmente activos (Tabla 8), en la estirpe mutante CSE2 no se observaba diferenciación de heterocistos (Fig. 33). Esto indica que se requiere un gen *ntcA* intacto para que tenga lugar el desarrollo de tales células diferenciadas.

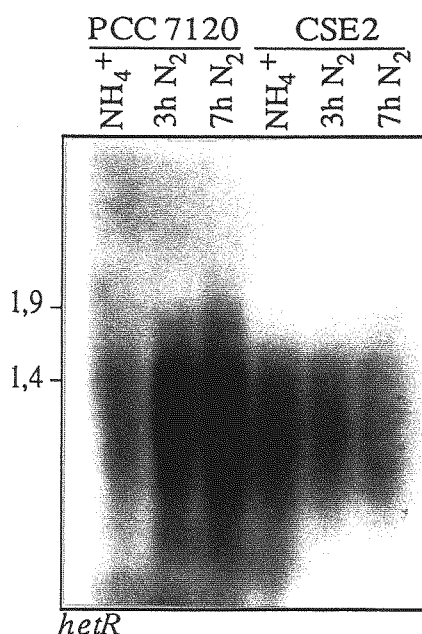


Figura 34. Análisis de la expresión del gen *hetR* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en la estirpe mutante CSE2.

RNA (35 µg) aislado de células cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas, durante 3 ó 7 h, en medio sin fuente de nitrógeno combinado se utilizó en experimentos de "Northern", usando como sonda un fragmento *Hae*II de 703 pb interno al gen *hetR* (Buikema y Haselkorn, 1991). Se indican los tamaños y posiciones de 2 bandas que corresponden a 2 transcritos del gen *hetR* previamente descritos por Buikema y Haselkorn (1991).

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito que el gen *hetR*, que se requiere para el desarrollo de heterocistos, se transcribe a bajo nivel en medios con nitrógeno combinado y que su expresión se incrementa de 3 a 5 veces tras la eliminación del nitrógeno combinado del medio de cultivo (Buikema y Haselkorn, 1991; Black *et al.*, 1993). Mediante experimentos de "Northern", se examinó el nivel de RNAm del gen *hetR* en la estirpe mutante CSE2 (Fig. 34). El incremento en el nivel de RNA de *hetR* que tiene lugar al transferir las células de la estirpe silvestre a medios sin nitrógeno combinado no se observó en la estirpe mutante. Por consiguiente, el gen *ntcA* se requiere para la inducción de la expresión de *hetR*.

3.3.6. Análisis de la expresión del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se estudió la expresión del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante experimentos de "Northern" en los que se utilizaba RNA aislado de células cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas durante 44 h en medios sin fuente de nitrógeno combinado. Se observaron niveles de expresión similares del gen *ntcA* en ambas condiciones nitrogenadas, distinguiéndose dos transcritos de tamaños 1,4 y 0,8 kb, respectivamente (Fig. 35). El tamaño del transcrito de 1,4 kb es muy superior al del gen *ntcA* (660 pb), lo que podría indicar una cotranscripción del gen *ntcA* con la *orf* observada detrás de él en el genomio de *Anabaena* sp. PCC 7120 (véase más adelante).

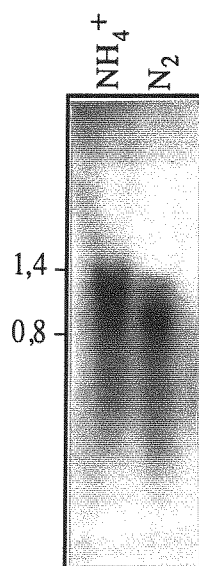


Figura 35. Estudio de la expresión de *ntcA* en *Anabaena* sp. PCC 7120, mediante análisis de "Northern".

El RNA utilizado procedía de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios sin fuente de nitrógeno combinado durante 44 h. El fragmento de DNA utilizado como sonda fue el fragmento *NcoI-SalI* (de aproximadamente 0,7 kb) de pCSAM61 (gentileza de Alicia Muro Pastor) que contiene el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 completo. A la izquierda se indica la posición y longitud (en kb) de los dos transcritos detectados.

3.3.7. El fenotipo pleiotrópico de la estirpe CSE2 es consecuencia de la mutación en el gen *ntcA*.

Para corroborar que todas las alteraciones fenotípicas de la estirpe CSE2 se debían a la mutación del gen *ntcA* se utilizaron dos aproximaciones diferentes.

de *ntcA* (apdo. 3.2.1), se transfirió mediante conjugación (apdo 2.3.1) desde *E. coli* a la estirpe mutante CSE2, seleccionándose exconjugantes capaces de crecer con nitrato. En este caso, la sucesión de medios utilizada en la conjugación fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG11. Se estudió mediante análisis de Southern la estructura genómica en la región de *ntcA* de uno de dichos exconjugantes, estirpe CSE3, observándose en la misma la presencia tanto de la versión mutada (fragmento *HincII* de 3,3 kb) como de la versión silvestre (fragmento *HincII* de 1,3 kb) de *ntcA* (Fig. 28, panel B). Al igual que su parental, la estirpe CSE2, la estirpe CSE3 era resistente a estreptomycin y espectinomycin. Estos resultados sugerían que en la generación de la estirpe CSE3, el plásmido pCSE4 se había integrado en el cromosoma de CSE2 mediante una recombinación simple. Este hecho se confirmó mediante hibridación usando como sonda el vector de pCSE4, pRL500 (Fig. 28, panel C), con la que mostraba hibridación la estirpe CSE3 pero no su parental CSE2. Además de crecer a expensas de nitrato, la estirpe CSE3 era capaz de crecer en ausencia de nitrógeno combinado, desarrollando heterocistos a una frecuencia similar a la de la estirpe silvestre, un fenotipo que no se había seleccionado durante la conjugación (no mostrado). Así pues, parece que la capacidad de crecimiento a expensas tanto de nitrato como de dinitrógeno está ligada a la presencia de un gen *ntcA* funcional.

Por otra parte, dado que la casete C.S3, utilizada para la generación de CSE2, presenta terminadores de la transcripción en ambos extremos (Prentki y Krisch, 1984), pudiendo dar lugar a efectos polares sobre la transcripción de los genes que la flanquean en el cromosoma (si el promotor de tales genes se situase por delante del sitio de inserción) se quiso descartar que el fenotipo de CSE2 se debiese a una interferencia de la inserción introducida con la transcripción de algún gen situado detrás de *ntcA*. Para ello, se procedió a la inserción en *Anabaena* sp. PCC 7120 de la casete C.S3 en el sitio *EcoRI* situado entre *ntcA* y la ORF que se encuentra detrás de este gen, cuya función se desconoce. El plásmido pCSE36B (Fig. 36) se transfirió mediante conjugación a *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver apdo. 2.3.1). La sucesión de medios utilizada fue: BG110A + LB 5%, BG110A y BG110A + Sm+Sp. Tras la obtención de clones en medio con sacarosa (apdo 2.3.1), varios de ellos se sometieron a cultivo líquido, fragmentación de filamentos y aislamiento de colonias en medio selectivo. Mediante análisis de Southern, se investigó la estructura genómica de varios de los clones así obtenidos. En todos ellos, el fragmento *HincII* silvestre de 1,3 kb había sido sustituido por otro de 3,3 kb resultado de la inserción de la casete C.S3 (2 kb) en el fragmento silvestre (Fig. 37). A uno de estos clones se le denominó CSE5.

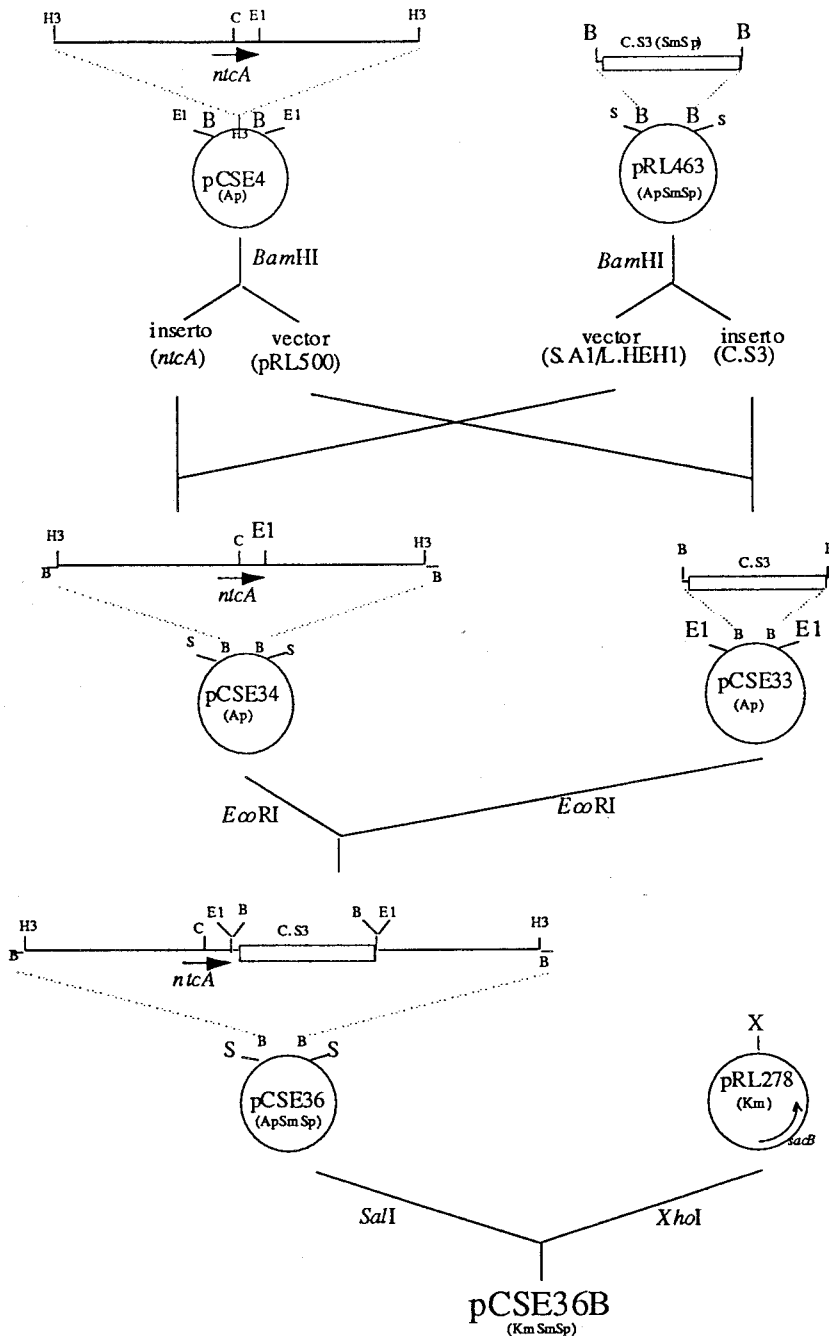


Figura 36. Esquema de la construcción del plásmido pCSE36B usado para la generación de la estirpe CSE5.

Los plásmidos pCSE4 (ver apdo. 3.2.1) y pRL463 (Elhai y Wolk, 1988a) se digirieron con *Bam*HI y sus insertos se intercambiaron para generar los plásmidos pCSE34 y pCSE33. La casete C.S3 procedente de pCSE33 y limitada por dianas *Eco*RI, se introdujo posteriormente en el único sitio *Eco*RI de pCSE34, situado detrás del gen *ntcA*, para producir el plásmido pCSE36. Por último, el inserto *Sal*I de este último se ligó a pRL278, linearizado en su único sitio *Xho*I, generándose el plásmido pCSE36B. Abreviaturas: H3, *Hind*III; C, *Cla*I; E1, *Eco*RI; S, *Sal*I; B, *Bam*HI; X, *Xho*I.

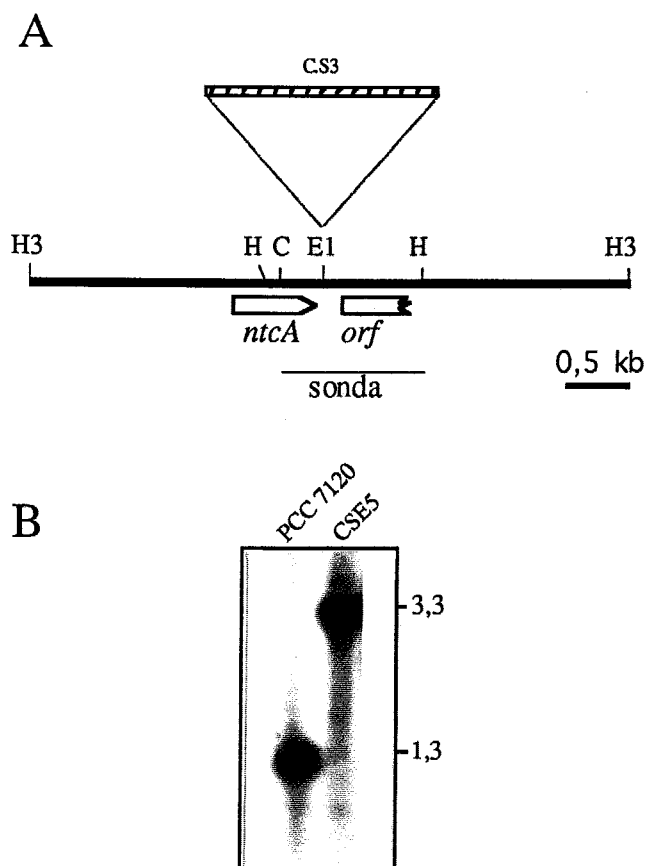


Figura 37. Análisis de la estructura cromosómica de la estirpe CSE5 en la región del gen *ntcA*.

A. Se muestra la posición de la inserción de la casete C.S3 insertada en la estirpe CSE5. Además se indica el fragmento de DNA usado como sonda en el análisis de tal estirpe que se muestra en la Fig. 37B. La ORF que se sitúa tras *ntcA* se muestra truncada puesto que no se ha secuenciado totalmente.

B. Análisis de Southern de la estructura de la región *ntcA* en la estirpe CSE5. DNA genómico digerido con *HincII* se sometió a hibridación con el fragmento señalado anteriormente. Se indican los tamaños (en kb) de los fragmentos detectados.

Se examinó la capacidad de la estirpe CSE5 de crecer en medio líquido usando nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno. Al igual que la estirpe silvestre PCC 7120, y a diferencia de la estirpe mutante CSE2, la estirpe CSE5 era capaz de crecer tanto en medio con nitrato como en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 38).

Así pues, el fenotipo de la estirpe CSE2 parece ser consecuencia de la mutación en el gen *ntcA* y no de la interferencia de la mutación que porta estirpe con la transcripción de otros genes próximos a *ntcA* en el cromosoma.



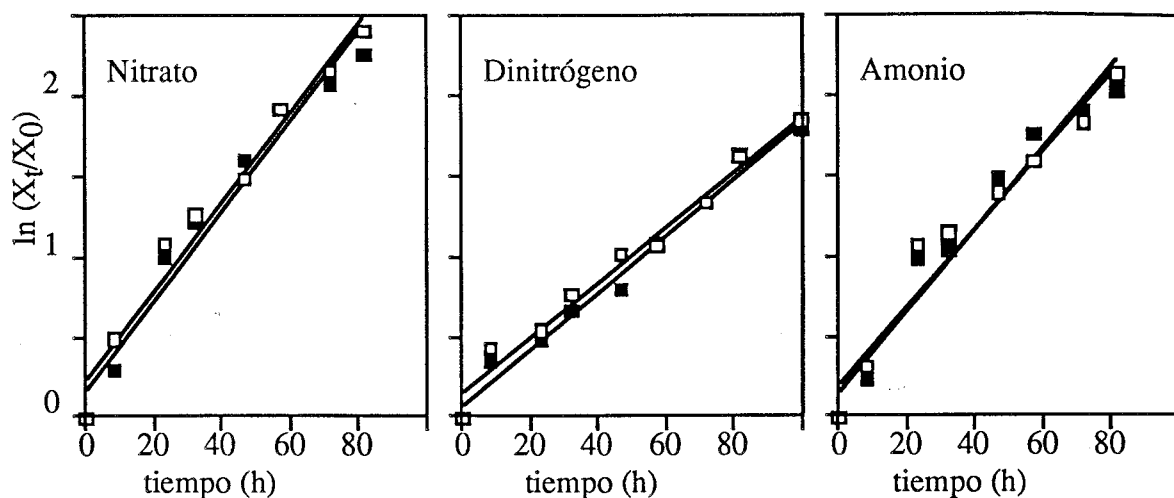


Figura 38. Crecimiento de la estirpe mutante CSE5 en medio con nitrato, sin nitrógeno combinado o con amonio.

Células de *Anabaena* sp. PCC 7120 (■) y de CSE5 (□) cultivadas con amonio se lavaron y se transfirieron a medios conteniendo amonio o nitrato, o sin nitrógeno combinado. Se inoculó a razón de $0,2 \mu\text{g}$ de clorofila $\cdot\text{ml}^{-1}$. Las suspensiones celulares obtenidas se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada cultivo para la determinación de la concentración de proteína (apdo. 2.1.1.2). X_t , μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ a tiempo t ; X_0 , μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ a tiempo cero.

3.3.8. Efecto de la alteración de la expresión de *ntcA*

Para estudiar el efecto de la alteración de los niveles de expresión del gen *ntcA* sobre la capacidad de asimilación de varias fuentes de nitrógeno en *Anabaena* sp. PCC 7120 se construyó el plásmido pCSE62 (Fig. 39), basado en el plásmido comercial pTrc99A, en el cual la expresión del gen *ntcA* está bajo el control del promotor P_{trc} . El plásmido pCSE62 estaba concebido para construir una estirpe derivada de *Anabaena* en la que la expresión estuviese regulada por IPTG. El plásmido pCSE62 conserva el oriT o sitio bom (origen de transferencia) de pBR322, lo que permite su transferencia por conjugación de *E. coli* a cianobacterias. El plásmido pCSE62 se envió, mediante conjugación, a la estirpe CSE2, mutante del gen *ntcA* (ver apdo 3.3.1). En este caso, los medios utilizados durante la conjugación fueron: BG11₀A + LB 5%, BG11₀A y BG11₀A + Em. Tras la selección de colonias axénicas de varios de los exconjugantes obtenidos, un grupo de ellas se inoculó en cajas con medio sin nitrógeno combinado suplementado o sin suplementar con IPTG 1 mM. En todos los casos se observó un crecimiento independiente de la presencia de IPTG. Uno de estos clones, estirpe CSE15, resultó ser $\text{Sm}^{\text{S}}\text{Sp}^{\text{S}}$. En él, la casete C.S3 presente en la estirpe CSE2 se habría perdido como resultado de la doble recombinación que habría tenido lugar entre el

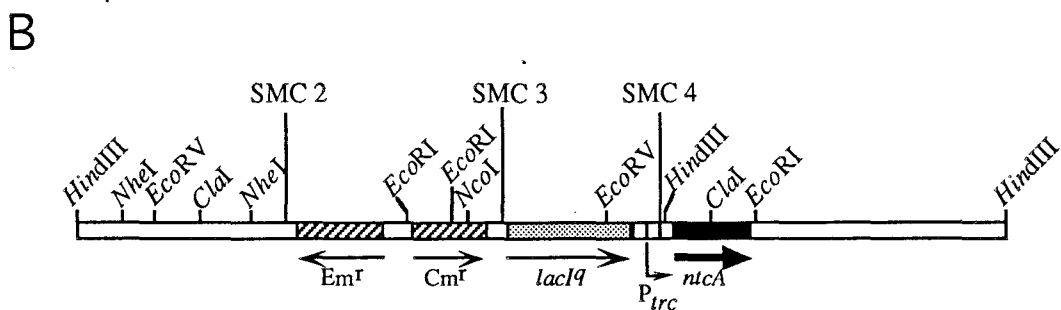
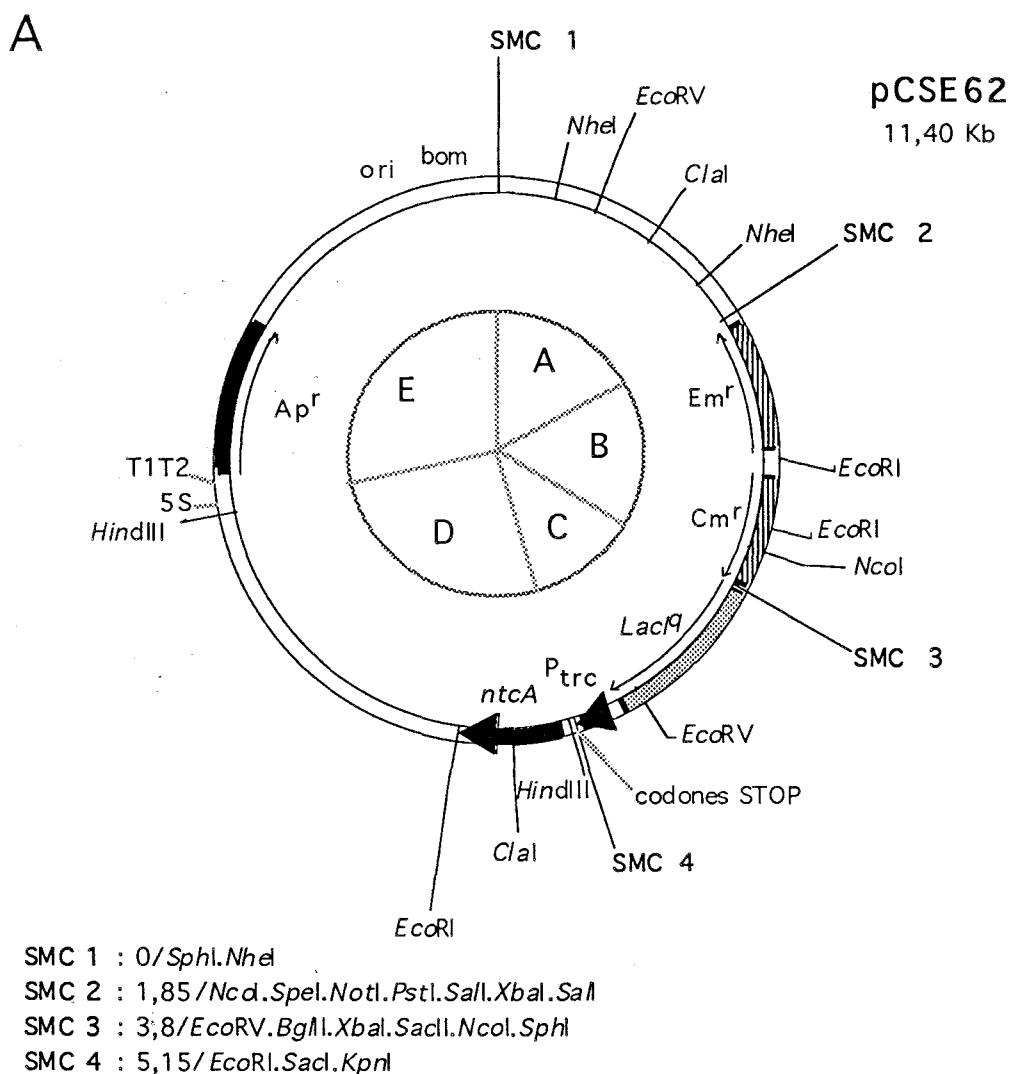


Fig. 39. Estructura del plásmido pCSE62 y estructura genética de la estirpe CSE15 en la región *ntcA*.

A. Diagrama representativo del plásmido pCSE62. Sector A, región anterior al gen *ntcA* en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, procedente de pCSE4; sector B, genes de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) y a eritromicina (Em^r), de pRL271 (Cai y Wolk, 1990); sector C, gen *lacI^q* y promotor *trc*, de pTrc99A (Amman *et al.*, 1988) y codones de parada de la traducción (en las tres fases), de pRL463 (Elhai y Wolk, 1988a); sector D, gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (con sus señales de traducción) y secuencias situadas detrás del mismo en el genoma de *Anabaena*, procedente de pCSE4, y sector E, parte restante del plásmido pTrc99A. (SMC, sitio múltiple de clonación; 5S y T1T2, terminadores de transcripción del operón *rrnB* de *E. coli*)

B. Estructura genética de la estirpe CSE15 en la región *ntcA*, resultado de la integración, por doble recombinación, del plásmido pCSE62 en el genoma de la estirpe CSE2. Esta estructura se comprobó mediante análisis de Southern (no mostrado).

genomio de la estirpe CSE2 y el DNA de *Anabaena* presente en el plásmido pCSE62, lo que provocaría la sustitución de la versión inactiva de *ntcA* presente en CSE2 por la versión silvestre bajo el control del P_{trc} presente en dicho plásmido. La estructura genética de la región *ntcA* en la estirpe CSE15 se muestra en la figura 1. La estirpe CSE15 también crecía en medios conteniendo nitrato con independencia de la presencia de IPTG. El crecimiento tanto a expensas del nitrato como del dinitrógeno de la estirpe CSE15 en células no tratadas con IPTG indicaría bien que el gen *laci9* no estaba ejerciendo su función represora, o que el nivel basal de expresión de *ntcA* desde el P_{trc} era suficiente para el crecimiento con nitrato o dinitrógeno.

Se estudió mediante experimentos de "Northern" la expresión del gen *ntcA* en la estirpe CSE15 (fig. 40). El RNA se aisló de células cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios sin fuente de nitrógeno combinado durante 44 horas. En la estirpe CSE15, la expresión de *ntcA* era similar en ambos medios, distinguiéndose dos transcritos de tamaños 1,4 y 0,8 kb, respectivamente, y aproximadamente 2,5 veces superior a la observada para la estirpe PCC 7120. El hecho de que el RNA se aislara de células cultivadas en medios sin IPTG y aún así se obtuviese una expresión de *ntcA* en la estirpe CSE15 superior a la existente en la estirpe PCC 7120 indicaba que el nivel basal de expresión del gen *ntcA* desde el P_{trc} en la estirpe CSE15 era superior al nivel de expresión del gen *ntcA* en la estirpe silvestre. Esto explicaba la capacidad de crecimiento de la estirpe CSE15 en medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado.

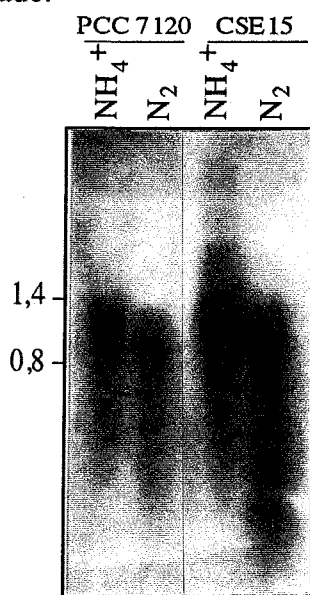


Figura 40. Análisis de "Northern" de la expresión de *ntcA* en la estirpe CSE15.

El RNA utilizado (35 μ g) procedía de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de CSE15 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios sin fuente de nitrógeno combinado e incubadas en este último durante 44 h. El fragmento de DNA utilizado como sonda fue el fragmento *NcoI-SalI* (de aproximadamente 0,7 kb) de pCSAM61 que contiene el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 completo. A la izquierda se indica la posición y longitud (en kb) de los dos transcritos detectados.

Por otra parte, se estudió si en la estirpe CSE15 había expresión en medios con amonio de genes sometidos a represión por amonio, regulados por NtcA. Para ello, se realizaron experimentos de "Slot Blot" con RNAs aislados de células de CSE15 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio e incubadas en medios con nitrato durante 5 h. Nuevamente se observó que la expresión del gen *ntcA* era similar en ambos medios, si bien algo superior en medio con amonio, tanto en la estirpe PCC 7120 como en la estirpe CSE15, siendo los niveles en esta última aproximadamente tres veces superiores a los observados en la primera (Tabla 9). No obstante, la expresión del operón *nir* en CSE15, al igual que ocurre en PCC 7120, estaba regulada por amonio (Tabla 9). En la estirpe CSE15 los niveles de expresión del operón *nir* eran algo superiores a los presentados por PCC 7120 y se traducían en niveles de actividad nitrato reductasa también algo superiores (Tabla 9).

Tabla 9. Niveles de expresión de los genes *ntcA* y *nir* y de actividad nitrato reductasa en la estirpe CSE15.

RNA de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de CSE15 cultivadas con amonio o cultivadas con amonio y transferidas a medios con nitrato e incubadas en este último durante 5 h se utilizó en experimentos de "Slot Blot". Se usaron como sonda el fragmento *ntcA* descrito en la Fig. 35 y un fragmento *DraI* de 0,7 kb que abarcaba la región N-terminal del gen *nir* (ver Fig. 1). Los resultados se cuantificaron en un InstantImager (Packard) y se normalizaron en base a la cantidad de radiactividad asociada a la muestra de nitrato (100%) de la estirpe silvestre PCC 7120 con cada una de las sondas.

Células de las estirpes que se indican cultivadas con amonio se lavaron y se resuspendieron en los medios con las fuentes de nitrógeno indicadas. Tras incubar en condiciones de cultivo durante 5 h, se determinó la actividad nitrato reductasa.

Estirpes y fuente de nitrógeno	Nivel de RNAm (%)		Nitrato reductasa (mU·mg ⁻¹ de proteína)
	<i>ntcA</i>	<i>nir</i>	
PCC 7120			
Nitrato	100	100	65
Amonio	151	0	3,9
CSE15			
Nitrato	285	240	90,7
Amonio	354	0	5,8

4. DISCUSIÓN

4.1. ASIMILACION DE NITRATO.

En este trabajo se ha clonado, mediante hibridación con una sonda del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato de la cianobacteria unicelular *Synechococcus* sp. PCC 7942, un fragmento de DNA del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 implicado en la asimilación de nitrato. Como se describió en la Introducción, el agrupamiento de genes de asimilación de nitrato de *Synechococcus* sp. PCC 7942 presenta la estructura *nir-nrtABCD-narB*, donde el gen *nir* cifra la nitrito reductasa, los genes *nrtABCD* el sistema de transporte de nitrato/nitrito y el gen *narB* la nitrato reductasa (Luque *et al.*, 1992, 1994b; Omata *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1993). Mediante hibridación y secuenciación parcial se pudieron identificar en la región clonada de *Anabaena* sp. PCC 7120 los genes *nir*, *nrtA*, *nrtB* y *nrtC*, siendo los porcentajes de identidades entre las proteínas deducidas y las correspondientes de *Synechococcus* sp. PCC 7942 superiores al 40% en todas las zonas secuenciadas (Tabla 2). La disposición de estos genes en *Anabaena* sp. PCC 7120 es la misma que en *Synechococcus* sp. PCC 7942. Por otra parte, Y. Cai y C. P. Wolk (Michigan State University, USA) han encontrado que los genes *nrtD* y *narB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 también forman parte de este agrupamiento de genes, situándose detrás de *nrtC* (resultados sin publicar). La estructura de este agrupamiento de genes en *Anabaena* sp. PCC 7120 sería pues similar a la que se presenta en *Synechococcus* sp. PCC 7942: *nir-nrtABCD-narB* (ver Fig. 41). Por lo tanto, en un mismo agrupamiento génico se encuentran tanto los genes implicados en el transporte del nitrato al interior celular (*nrtABCD*) como los implicados en su reducción hasta amonio (*nir* y *narB*) que, como se mencionó en la Introducción, constituyen los dos pasos iniciales de la asimilación del nitrato. Esta situación no se da en algunas otras cianobacterias diferentes a *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Synechococcus* sp. PCC 7942 en las que también se han identificado algunos genes relacionados con la asimilación de nitrato, como es el caso de la cianobacteria unicelular no fijadora de dinitrógeno *Synechocystis* sp. PCC 6803 o de la cianobacteria filamentosa no formadora de heterocistos *Phormidium laminosum* (véase Introducción).

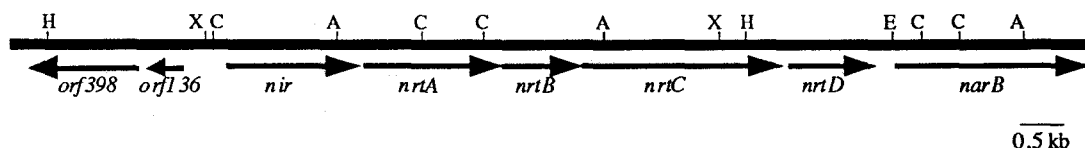


Figura 41. Estructura de la región genómica de *Anabaena* sp. PCC 7120 donde se localiza el operón de asimilación de nitrato.

Abreviaturas: H, *Hind*III; X, *Xba*I; C, *Cla*I; A, *Acc*I; E, *Eco*RI.

Delante del gen *nir* y situadas en la cadena complementaria del DNA se han identificado dos ORFs cuyos productos serían polipéptidos de 136 (*orf136*) y 398 (*orf398*) aminoácidos (ver Fig. 41). El producto hipotético de la *orf136* sería homólogo a proteínas sulfoférricas de transporte de electrones, del tipo de una presente en el complejo del citocromo *b₆-f*, y el de la *orf398* a proteínas de la familia CpcE/RpcE/PceE, relacionadas con la síntesis de bilinas o la unión del grupo cromóforo a la apoproteína de las biliproteínas. Por tanto, los productos de la *orf136* y la *orf398* no serían homólogos a los productos de los genes *nirB* y *ntcB* identificados en *Synechococcus* sp. PCC 7942 en una posición similar respecto al gen *nir* (Suzuki *et al.*, 1995a). Se han construido estirpes mutantes en *orf136* o en *orf398*, las estirpes CSE16 y CSE17, respectivamente. Ambas estirpes son capaces de crecer a expensas del nitrato y muestran niveles de las actividades nitrato y nitrito reductasas comparables a los de la estirpe silvestre PCC 7120. Por tanto, ninguna de estas ORFs parece requerirse para la asimilación del nitrato en *Anabaena* sp. PCC 7120, al menos en condiciones de laboratorio.

El agrupamiento génico *nir-nrtABCD-narB* identificado en *Anabaena* sp. PCC 7120 está implicado en la asimilación del nitrato por parte de esta cianobacteria. El estudio del fenotipo del mutante CSE1, que presenta la sustitución del gen *nir* y de la mayor parte del gen *nrtA* por la casete de resistencia a estreptomycinina y espectinomycinina C.S3 (que porta terminadores de la transcripción y codones de terminación de la traducción en sus dos extremos), así lo demostró. El mutante CSE1 es incapaz de crecer a expensas de nitrato y no presenta ni actividad nitrito reductasa ni actividad nitrato reductasa. Esto permite deducir que el agrupamiento de genes clonado es imprescindible para la asimilación del nitrato por parte de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se han construido asimismo mutantes en el gen *nrtA*, las estirpes CSE9 y CSE10, en las que la casete C.K1 se encuentra insertada en el mismo sentido o en sentido opuesto a *nrtA*, respectivamente. A pesar de mostrar niveles de las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa similares a los de la estirpe PCC 7120, las estirpes CSE9 y CSE10 mostraban un consumo muy reducido de nitrato cuando éste se suministraba en el medio a concentración 0,1 mM (Tabla 5). Por tanto, la proteína NrtA debía estar implicada en el transporte activo del nitrato al interior celular en *Anabaena* sp. PCC 7120. A concentración 1 mM de nitrato en el medio las estirpes CSE9 y CSE10 desarrollaban un porcentaje de heterocistos similar al de la estirpe silvestre y al de ellas mismas en medios sin nitrógeno combinado, lo que era consistente con la incapacidad de asimilación de nitrato de estas estirpes. Sin embargo, a concentración 17,6 mM de nitrato en el medio de cultivo ambas estirpes consumían nitrato a una tasa significativa (ver Tabla 5), por lo que NrtA parecía ser dispensable para el consumo de nitrato a esta concentración. Se ha sugerido que, a esta concentración de nitrato en el medio, la entrada de nitrato es mayoritariamente pasiva en *Synechococcus* sp. PCC

7942 (Omata, 1991), lo que también podría ocurrir en *Anabaena* sp. PCC 7120. Alternativamente, en esta cianobacteria podría expresarse un sistema de transporte de nitrato de baja afinidad que no estuviera presente en *Synechococcus* sp. PCC 7942. A 17,6 mM de nitrato, el porcentaje de heterocistos de las estirpes CSE9 y CSE10 era un 50% del observado en medio sin fuente de nitrógeno. Es sabido que el nitrato actúa como represor nutricional del desarrollo de estas células especializadas en la fijación de dinitrógeno (Flores y Herrero, 1994). Así pues, el desarrollo de heterocistos por los mutantes de *nrtA* en presencia de nitrato era indicativo de que el nitrato no constituía una buena fuente de nitrógeno para los mismos. Probablemente esto se deba a una tasa de entrada de nitrato en la célula insuficiente para permitir un crecimiento óptimo y para, tras su reducción hasta amonio, reprimir el desarrollo de los heterocistos. Parece pues que el transporte activo del nitrato, en el que participa NrtA, tiene un papel importante en el consumo del nitrato no sólo a baja sino también a altas concentraciones del mismo en el medio.

La falta de actividad nitrito reductasa en el mutante CSE1, discutida más arriba, es fácilmente explicable ya que en la generación del mismo se había eliminado el gen *nir*. Por otra parte, el que el mutante CSE1 no expresara actividad nitrato reductasa podría explicarse asumiendo que la mutación tenía efectos polares sobre la expresión del gen estructural de la nitrato reductasa, *narB*, localizado detrás del sitio de la inserción de la casete C.S3 en la estirpe CSE1.

Para ensayar esta hipótesis, se estudió mediante hibridación la expresión del agrupamiento de genes de asimilación de nitrato en la estirpe CSE1, usando sondas correspondientes a segmentos del agrupamiento situados delante y detrás del sitio de inserción de la casete C.S3 (en la zona *nir-nrtA*). Se obtuvo señal de hibridación cuando se utilizaba la sonda de delante del sitio de inserción de la casete C.S3, pero no cuando las sondas correspondían a segmentos situados detrás de ella. Esto indica que el agrupamiento de genes se expresa desde un promotor situado delante del sitio de inserción de la casete C.S3 en CSE1. Es decir, el agrupamiento de genes identificado se comporta como un operón que se expresa desde un promotor situado delante del gen *nir*. También se ha descrito el comportamiento como operón del agrupamiento génico de asimilación del nitrato de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1992, 1994b; Suzuki *et al.*, 1993).

Por otra parte, es interesante discutir el comportamiento de las estirpes CSE9 y CSE10 (*nrtA*::C.K1), que muestran niveles de actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa similares a los de la estirpe silvestre. La falta de efecto de la inserción de la casete en estas estirpes sobre la actividad nitrito reductasa se debería a que el gen *nir* se sitúa por delante del gen *nrtA* en el agrupamiento de genes. El hecho de que los mutantes presentasen niveles normales y regulados de actividad nitrato reductasa, es decir, falta de efecto polar sobre el gen *narB* de la inserción de C.K1 en *nrtA*, debía ser

consecuencia de que la casete C.K1 carece de terminadores de la transcripción (Mazodier *et al.*, 1985) y de la no interferencia de la casete de resistencia con la utilización del promotor propio del operón, como consecuencia de poseer un promotor que es utilizado débilmente en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Elhai, 1993). No obstante, la misma casete de resistencia insertada en el gen *nrtD* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 provoca una expresión constitutiva o prácticamente nula del gen *narB* según se insertara en el mismo sentido o en sentido opuesto al gen *nrtD*, respectivamente (Luque *et al.*, 1994b).

Estudios de expresión llevados a cabo mediante experimentos de elongación del cebador y de "Northern" pusieron de manifiesto que el operón de asimilación de nitrato no se expresa en presencia de amonio, pero sí en ausencia de amonio tanto con nitrato como sin ningún compuesto de nitrógeno combinado, aunque la cantidad de RNAm del operón presente en la célula parece ser superior en presencia de nitrato que en ausencia de nitrógeno combinado. También se ha observado una expresión del agrupamiento génico *nirA-nrtA* de *Plectonema boryanum* en ausencia de amonio con independencia de la presencia de nitrato en el medio (Suzuki *et al.*, 1995b). Por otra parte, en este trabajo hemos puesto de manifiesto que la cantidad de mRNA de la zona 5' del operón es superior a la del de la zona 3' del mismo, y que las diferencias son mayores en ausencia de nitrógeno que en presencia de nitrato. Esto último podría ser indicativo de una mayor estabilidad del RNAm del operón en medios con nitrato, lo que contribuiría a determinar mayores niveles de las proteínas de asimilación del nitrato en presencia de este compuesto. No se pueden descartar, sin embargo, efectos del nitrato a nivel de estabilidad de las proteínas, de la traducción o del inicio de la transcripción. En *Klebsiella pneumoniae* se ha propuesto la existencia de inducción por nitrato del sistema *nasFEDCBA* mediante un mecanismo de antiterminación de la transcripción que aún está por confirmar (Goldman *et al.*, 1994).

El promotor del operón *nir* se sitúa a aproximadamente entre 460 y 510 pb del codón de iniciación del gen *nir*. Mediante experimentos de elongación del cebador, se ha determinado un sitio de inicio de la transcripción que se localiza a 460 pb por delante del gen *nir*. Dicho inicio de la transcripción se usa en ausencia de amonio tanto en ausencia de nitrato como en su presencia, si bien el RNAm correspondiente parecía ser más abundante en este último caso. El inicio de transcripción mencionado está precedido, a 6 pb, por una región -10 (TAN₃T) que se adapta a la del promotor tipo consenso σ^{70} de *Escherichia coli*. No se encuentra, sin embargo, una región -35 consenso, pero en su lugar se presenta una secuencia que se adapta al sitio de unión descrito para la proteína reguladora NtcA (GTAN₈TAC) (Luque *et al.*, 1994a), que está separada de la región -10 por 22 pb. Ésta es la estructura típica del promotor regulado por NtcA descrito en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a). Las observaciones de regulación por amonio y de existencia de una secuencia promotora

que se ajusta a la de los promotores regulados por NtcA sugirieron que el operón de asimilación de nitrato de *Anabaena* sp. PCC 7120 podría regularse por NtcA.

Del estudio del fenotipo de la estirpe CSE18, la cual presenta una inserción de la casete C.S3 en el sitio de restricción *ClaI* situado entre el gen *nir* y el sitio de iniciación de la transcripción del operón, se dedujo que, además del descrito, no parecen existir otros promotores a lo largo del operón. Al igual que la estirpe CSE1, la estirpe CSE18 sólo muestra niveles residuales o prácticamente nulos (siempre inferiores a los presentados por su estirpe parental EF116 incluso en medio con amonio) de actividades nitrato reductasa y nitrato reductasa, lo que es indicativo de una falta de expresión de los genes *nir* y *narB*, respectivamente, en dicha estirpe.

Mediante experimentos de elongación del cebador se determinó el sitio de inicio de la transcripción de la *orf136*. Éste se sitúa a 144 pb del ATG de dicha ORF. Delante de este inicio de transcripción se encontraron las secuencias 5'TAAAAT3' y 5'TTCTAA3' que pueden constituir, respectivamente, la regiones -10 y -35 de un promotor similar al tipo consenso σ^{70} de *E. coli* (Fig. 42). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han identificado otros sitios de inicio de la transcripción que se usan constitutivamente. Éste es el caso del sitio de inicio de la transcripción determinado para el gen *argC* (Floriano *et al.*, 1994), de uno de los que presenta el gen *argD* (Floriano *et al.*, 1994) y del correspondiente al denominado RNA_{II} del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983). En los tres casos, estos sitios de inicio de la transcripción, al igual que ocurre con el de la *orf136*, se encuentran precedidos por secuencias, con el espaciado adecuado entre ellas, que podrían representar las regiones -10 y -35 de promotores tipo consenso σ^{70} de *E. coli* (Fig. 42). Es interesante recordar que, como se mencionó en la Introducción, la RNA polimerasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 con el factor SigA es capaz de reconocer secuencias que se adaptan a aquéllas de los promotores de *E. coli* reconocidos por la RNA polimerasa con el factor σ^{70} . Es de destacar que el promotor del operón *nir* y el de la *orf136* solapan en el DNA y que sólo existe un sitio de unión para NtcA en la región intergénica entre *nir* y la *orf136*, a diferencia de lo que ocurre en *Synechococcus* sp. PCC 7942 entre los genes *nir* y *nirB* (véase Introducción). En experimentos de "Northern" también se detectó expresión de la *orf136* en todas las condiciones de nutrición nitrogenada ensayadas, siendo los niveles de expresión distintos dependiendo de la fuente de nitrógeno presente en el medio. Tanto *orf136* como *orf398* se expresan más en presencia de nitrato que en ausencia de nitrógeno combinado y más en esta última condición que en presencia de amonio. Cuando se usaba una sonda de la *orf136* se obtenía mayoritariamente un transcrito de 0,6 kb, que podía contener a esta ORF completa, y otros transcritos de mayor tamaño que podían englobar también a la *orf398*. Con una sonda de esta última sólo se obtenían los transcritos de mayor tamaño. Esto sugiere que ambas ORFs podrían cotranscribirse desde el promotor situado delante de la *orf136*.

Consenso σ^{70}	T ₈₂ T ₈₄ G ₇₈ A ₆₅ C ₅₄ A ₄₅ — 15/20n —	T ₈₀ A ₉₅ t ₄₅ A ₆₀ a ₅₀ T ₉₆ — 5/9n — +1
<i>argC</i>	TTTATT — 18n —	TAAAAT — 5n — +1
<i>argD</i>	TTGCCA — 16n —	TAATGT — 5n — +1
<i>glnA</i> (RNAII)	TTGTGC — 18n —	TAATAT — 5n — +1
<i>orf136</i>	TTCTAA — 20n —	TAAAAT — 6n — +1

Figura 42. Comparación de la secuencia del posible promotor de la *orf136* con las de algunos promotores constitutivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y con la del promotor tipo consenso σ^{70} de *E. coli*.

Los promotores de los genes *argC* y *argD* han sido descritos por Floriano *et al.* (1994) y el del *glnA* por Tumer *et al.* (1983).

Como se ha mencionado anteriormente, el sitio de inicio de la transcripción del operón *nir* delimitaba una región del DNA de 460 pb de longitud que ha de transcribirse pero en la que no se ha podido detectar ORF alguna. Son muchos los sistemas procarióticos donde una región líder transcrita pero no traducida juega un papel importante en la expresión del sistema, por influir bien en la estabilidad del RNAm o bien en la probabilidad de traducción de dicho mensajero (Petersen, 1992). Sería interesante estudiar si la región líder que presenta el operón *nir* en *Anabaena* sp. PCC 7120 tiene un papel en el control postranscripcional de la expresión de dicho operón.

4.2. REGULACIÓN MEDIADA POR *ntcA*

Las cianobacterias son capaces de asimilar diferentes compuestos nitrogenados inorgánicos. El amonio presente en el medio externo actúa como un represor nutricional de la expresión de los sistemas de asimilación del nitrato, del dinitrógeno (incluyendo el desarrollo de los heterocistos) e, incluso, de sí mismo. Para ejercer su efecto represor el amonio ha de ser incorporado a esqueletos carbonados mediante la ruta GS-GOGAT (Flores y Herrero, 1994).

Usando como sonda un fragmento del gen *ntcA* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 se clonó mediante hibridación el gen *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. El polipéptido deducido de su secuencia mostraba un 79% de aminoácidos comunes con la proteína NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942. También se clonó mediante hibridación el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 usando, en este caso, una sonda del gen de *Synechocystis* sp. El polipéptido deducido de la secuencia de *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 mostraba un 77 y un 86% de aminoácidos comunes con las proteínas

NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, respectivamente. Esto indica que la proteína NtcA se encuentra altamente conservada en estas cianobacterias. De hecho, se detectaron secuencias de DNA que hibridaban con sondas de los genes *ntcA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sección taxonómica I) o de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Sección IV) en los genomas de diferentes cianobacterias: *Anabaena* sp. PCC 6411 (Sección IV), *Nostoc* sp. PCC 6719 (Sección IV), *Anabaena* sp. PCC 7937 (*Anabaena variabilis*) (Sección IV), *Calothrix* sp. PCC 7601 (Sección IV), *Nostoc* sp. PCC 7422 (Sección IV), *Fischerella muscicola* UTEX 1829 (Sección V), *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (Sección III), *Synechococcus* sp. PCC 7202 (Sección I) y *Synechocystis* sp. PCC 6308 (Sección I). Algunas de éstas son cianobacterias filogenéticamente muy distantes, tales como *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, *Synechocystis* sp. PCC 6308 y las estirpes formadoras de heterocistos (Giovannoni *et al.*, 1988). La alta conservación de secuencia de aminoácidos entre las proteínas NtcA conocidas hasta el momento y la existencia de secuencias homólogas a *ntcA* en los genomas de cianobacterias muy diferentes indican que el gen *ntcA* se encuentra ampliamente distribuido entre las cianobacterias. Se planteó entonces la cuestión de si el gen *ntcA* podría jugar un papel central en la regulación de la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno en otras cianobacterias diferentes a *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Esta cuestión se abordó en *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante la generación de un mutante del gen *ntcA*, estirpe CSE2 (ver apdo. 3.3.1). El mutante CSE2 es incapaz de desreprimir en ausencia de amonio la expresión del operón *nir* de asimilación de nitrato, del operón *nifHDK* (que cifra la nitrogenasa), del gen *glnA* (que cifra la glutamina sintetasa) y del gen *hetR* (regulador del desarrollo de los heterocistos). Esto se refleja en que dicha estirpe presenta en presencia o ausencia de amonio niveles de las actividades enzimáticas nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa y nitrogenasa similares a las presentadas por la estirpe PCC 7120 en presencia de amonio. Asimismo, la estirpe CSE2 es incapaz de desarrollar heterocistos en medios sin nitrógeno combinado. Consecuentemente, el mutante es incapaz de crecer a expensas de nitrato o de dinitrógeno. Por tanto, la proteína NtcA, además de regular los procesos de asimilación de nitrato y amonio, tal como ocurre en la cianobacteria unicelular no fijadora de dinitrógeno *Synechococcus* sp. PCC 7942, en *Anabaena* sp. PCC 7120 regula también la asimilación del nitrógeno atmosférico. El mutante CSE2 ha permitido comprobar asimismo que NtcA también controla la expresión del sistema de transporte de urea de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Ana Valladares, resultados sin publicar).

Así pues, el análisis de la estirpe mutante CSE2 mostró que, al igual que ocurre en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Vega-Palas *et al.*, 1990), la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 ha de actuar como un regulador positivo de la expresión de sistemas génicos sujetos a represión por amonio, ya que la inactivación del gen *ntcA* provoca la no expresión, o una expresión disminuida, de tales sistemas.

Paralelamente a este trabajo, Wei *et al.* (1993) clonaron el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (denominado en principio por ellos *bifA*) por un procedimiento de interferencia transcripcional basada en la capacidad que muestra la proteína NtcA de unirse a secuencias promotoras del gen *xisA*. Estos autores también han comprobado que se requiere un gen *ntcA* intacto para que la estirpe PCC 7120 pueda crecer con nitrato o dinitrógeno (Wei *et al.*, 1994).

Se analizó la expresión del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en medios con amonio, con nitrato o sin nitrógeno combinado. Se observó que los niveles de expresión no eran muy diferentes en los tres medios, por tanto, no parece existir una represión por amonio de la expresión de dicho gen, al contrario de lo que ocurre en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a). Wei *et al.* (1994) y Ramasubramanian *et al.* (1996) han descrito la presencia de mayores niveles de RNAm en medios sin fuente de nitrógeno que en medios con amonio, sin observarse, sin embargo, una fuerte represión como la observada en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a). Se ha descrito la existencia de dos (de 0,8 y 1,4 kb; Wei *et al.*, 1994) o tres (de 0,8, 1,0 y 1,4 kb; Ramasubramanian *et al.*, 1996) transcritos del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Mientras que el transcrito de 1,4 kb parece utilizarse en medios con nitrógeno combinado, el transcrito de 1,0 kb parece utilizarse sólo en ausencia de nitrógeno combinado y el de 0,8 kb en ambas condiciones. Nosotros sólo hemos detectado dos transcritos, de 0,8 y 1,4 kb, utilizándose el transcrito de 0,8 kb tanto en medios con amonio como en medios sin fuente de nitrógeno combinado y el de 1,4 kb sólo en medios con amonio. En *Synechococcus* sp. PCC 7942 se ha descrito un transcrito de 1,3 kb para el gen *ntcA* (Luque *et al.*, 1994a).

Como se acaba de mencionar, Ramasubramanian *et al.* (1996) han identificado tres sitios de inicio de la transcripción para el gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Uno de ellos, situado en la posición -49 con respecto al ATG del gen *ntcA*, es cuantitativamente el más importante, parece utilizarse en todas las condiciones de nutrición nitrogenada ensayadas, y tras la eliminación del nitrógeno del medio de cultivo, este sitio de inicio de la transcripción parece presentar un máximo en su utilización. Los otros dos sitios, situados en las posiciones -180 y -190 respecto al ATG de *ntcA*, sólo se utilizan en ausencia de nitrógeno combinado, el de la posición -180 siguiendo el mismo patrón en ausencia de nitrógeno combinado que el seguido por el de la posición -49. El situado en la posición -190 sólo se encuentra en los heterocistos diferenciados. Estos dos últimos sitios de inicio de la transcripción parecen ser imprescindibles para el crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 a expensas del dinitrógeno (Wei *et al.*, 1994). En *Synechococcus* sp. PCC 7942 sólo se distinguen dos sitios de inicio de la transcripción para el gen *ntcA*. Uno de ellos, situado en la posición -120 con respecto al primer codón del gen *ntcA*, se expresa débilmente en todas las condiciones nitrogenadas; el otro, situado en la posición -109 respecto al primer codón

de *ntcA*, se expresa en ausencia de amonio y su uso se regula por NtcA (Luque *et al.*, 1994a)

En *Synechococcus* sp. PCC 7942, NtcA regula su propia expresión uniéndose a secuencias situadas delante del gen *ntcA*, que constituyen un típico promotor regulado por NtcA (Luque *et al.*, 1994a). En *Anabaena* sp. PCC 7120 también se ha descrito la unión de la proteína NtcA a secuencias situadas delante del gen (Ramasubramanian *et al.*, 1996). No obstante, estas secuencias, que se sitúan entre los sitios de inicio de la transcripción -49 y -180, no presentan la típica estructura palindrómica GTAN₈TAC del sitio de unión al DNA de la proteína NtcA y no constituyen un típico promotor regulado por NtcA. No está claro, por tanto, como se regularía la expresión del gen *ntcA* desde los sitios -180 y -190. Delante de estos sitios tampoco se identifican secuencias que se puedan corresponder con las regiones -10 y -35 de los promotores tipo consenso σ^{70} de *E. coli*. Por otra parte, delante del sitio de inicio de la transcripción situado a -49 sólo existe una región -10 identificable pero no una región -35. El estudio del uso de los distintos sitios de inicio de la transcripción en el mutante del gen *ntcA* podría proporcionar información acerca de la regulación de la expresión de este gen.

Como se pudo comprobar mediante la generación del mutante CSE5 (que presenta la inserción de la casete C.S3 detrás del gen *ntcA*) el fenotipo de la estirpe CSE2 se debía exclusivamente a la mutación del gen *ntcA* y no al efecto que sobre la expresión de otras ORFs próximas al mismo podría tener la inserción de la casete C.S3. Detrás de *ntcA* existe una ORF que no muestra homología con ninguna proteína depositada en los bancos de datos. Esta ORF se ha detectado tanto en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Wei *et al.*, 1993) como en *Synechococcus* sp. PCC 7942, habiéndose secuenciado íntegramente en esta última y estando constituida por 855 pb (resultados no publicados de nuestro laboratorio). Teniendo en cuenta la posición de los distintos sitios de inicio de la transcripción y el tamaño del gen *ntcA* (0,66 kb aproximadamente), el RNAm de 1,3 ó 1,4 kb del gen *ntcA* podría tener en ambas cianobacterias capacidad de englobar el mensaje de dicha ORF (Luque *et al.*, 1994a; Wei *et al.*, 1994), lo que podría indicar la cotranscripción de la misma con *ntcA*. Aunque el fenotipo de la estirpe CSE5 indica que la función de la ORF situada detrás de *ntcA*, al menos en condiciones de laboratorio, es prescindible para la asimilación de fuentes de nitrógeno diferentes al amonio, quizás en un medio natural estas ORFs podrían tener un papel relacionado con la acción de NtcA, ya que, en los sistemas procarióticos los genes que se cotranscriben suelen tener una relación funcional.

Como se ha discutido anteriormente, delante del inicio de transcripción del operón de asimilación de nitrato se encuentran secuencias que se adaptan perfectamente a las del promotor regulado por NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a). El uso de este inicio de la transcripción estaba regulado por amonio y no tenía

lugar en la estirpe mutante CSE2. Recientemente hemos observado en nuestro laboratorio que la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de unirse a un fragmento de DNA anterior al gen *nir* que contiene el sitio de unión de NtcA propuesto anteriormente (sin publicar). Se trata, pues, de un típico promotor regulado por la proteína NtcA, con la misma estructura que los promotores regulados por NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (ver Fig. 43).

Por otra parte, se han observado varios sitios de inicio de la transcripción para el gen *glnA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tumer *et al.*, 1983). El correspondiente a RNA_I se usa en ausencia de amonio en la estirpe silvestre PCC 7120 pero no en la estirpe mutante CSE2. Delante del mismo se encuentra un posible sitio de unión al DNA de la proteína NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a) separado por 23 pb de una posible región -10 de los promotores tipo consenso σ^{70} de *E. coli* (ver Fig. 43). Se ha descrito que la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de unirse a secuencias situadas delante del inicio de transcripción correspondiente a RNA_I del gen *glnA* (Chastain *et al.*, 1990; Ramasubramanian *et al.*, 1994). Por tanto, delante de este inicio de transcripción se localiza un promotor regulado por la proteína NtcA con la típica estructura de los promotores regulados por NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a).

<i>glnA</i> RNA _I :	TTCTGTAACAAAGACTTACAAAAGTCTAATGTTTAGAATCTACGATATTTTC +1
<i>nir</i> :	TTTTGTAGCTACTTATACATATTTTACCTGAGATCCCGACA.TAACCTTAGAAG+1
Promotor consensoGTA...N ₈ ...TAC.....N ₂₂TA...T.N _{5/6} +1
NtcA:	

Fig. 43. Secuencia de nucleótidos de las regiones de DNA situadas delante del inicio de transcripción correspondiente al RNA_I del gen *glnA* y del del operón *nir* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se muestra asimismo la secuencia de DNA consenso para los promotores regulados por NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque *et al.*, 1994a).

Mientras que en este trabajo se ha observado expresión del inicio de transcripción correspondiente al RNA_{II} del gen *glnA* independientemente de la fuente de nitrógeno presente en el medio, Tumer *et al.* (1983) describieron que este inicio de transcripción sólo se expresaba en medios con amonio. Delante de dicho sitio se encuentran secuencias, 5'TAATAT3' y 5'TTGTGTC3', que podrían perfectamente representar las regiones -10 y -35 de promotores similares a los del consenso tipo σ^{70} de *E. coli* (ver Fig. 42 y 44). Las diferencias existentes entre nuestros resultados y los presentados por Tumer *et al.* (1983) podían ser debidas a que las condiciones de

incubación utilizadas en ausencia de amonio por ambos grupos eran diferentes (anaerobiosis en una atmósfera de argon en el caso de Tumer *et al.*, frente a aerobiosis en el nuestro). Su expresión en presencia de amonio es consistente con el hecho de que la operatividad del promotor que da lugar a RNA_{II} no requiera el concurso de la proteína NtcA, como pone de manifiesto el hecho de que se exprese a altos niveles en el mutante CSE2. Por su parte, el inicio de transcripción correspondiente al RNA_{IV} se utiliza menos en medios que contienen amonio que en ausencia de amonio y apenas se utiliza en la estirpe CSE2. Sin embargo, delante de este inicio de transcripción no se detectan secuencias que se asemejen al promotor consenso descrito para los promotores regulados por NtcA (Fig. 44) ni para el promotor consenso tipo σ^{70} de *E. coli*. Es posible que el promotor para RNA_{IV} esté regulado por NtcA de una forma indirecta. El hecho de que en el mutante CSE2 no se usen los inicios correspondientes a RNA_I y a RNA_{IV} explica que la expresión del gen *glnA* esté disminuida en la estirpe CSE2. Por otra parte, la expresión desde el inicio correspondiente a RNA_{II} explicaría los niveles basales de actividad GS en medios con amonio en *Anabaena* sp. PCC 7120.

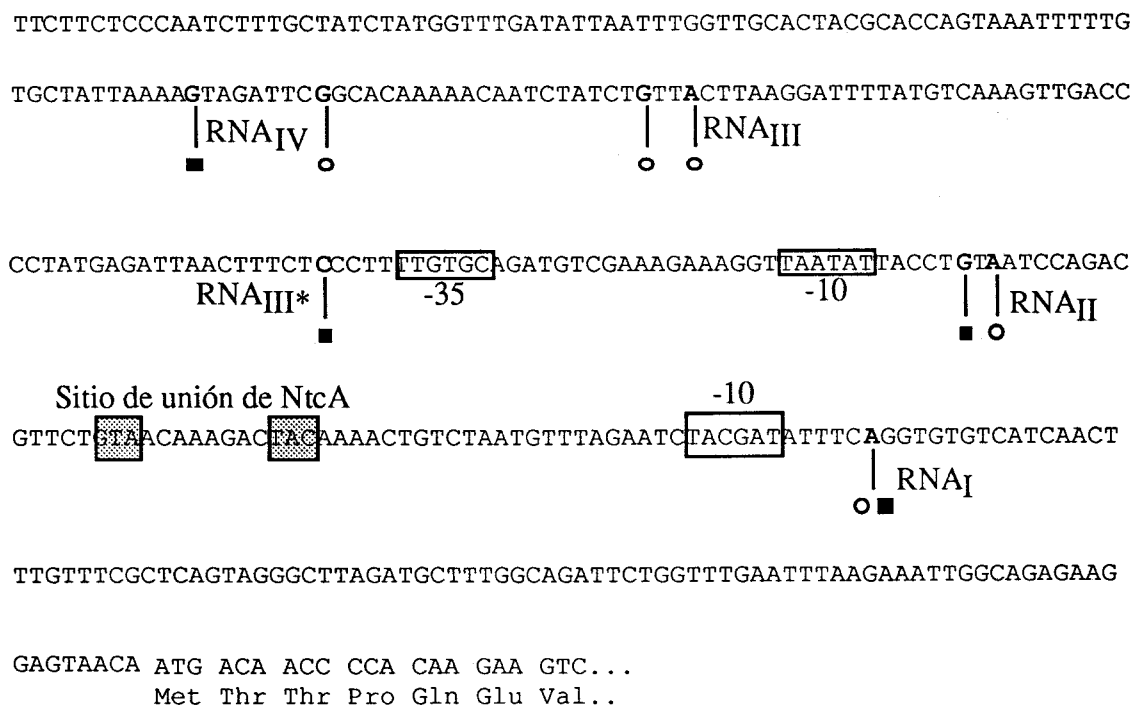


Figura 44. Sitios de inicio de la transcripción del gen *glnA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se indican los sitios de inicio de la transcripción descritos en este trabajo (■) y los obtenidos por Tumer *et al.* (1983) (○) para el gen *glnA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. También se señalan las secuencias correspondientes a las regiones -10 de RNA_I y RNA_{II} y -35 de RNA_{II}, al igual que la secuencia del sitio de unión de la proteína NtcA.

La expresión del gen *glnA* se ha caracterizado en otra cianobacteria filamentosa no formadora de heterocistos, *Calothrix* sp. PCC 7601. La secuencia de nucleótidos de

la región anterior al gen *glnA* en PCC 7601 es 76,5% idéntica (en 380 pb) a la de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Liotenberg, 1995). En *Calothrix* sp. PCC 7601 se han observado dos transcritos para el gen *glnA*, uno de 1,6 kb que predomina en células cultivadas con nitrato y otro de 1,8 kb que predomina en células cultivadas con amonio (Elmorjani *et al.*, 1992). También se han identificado los sitios de inicio de la transcripción del gen *glnA* de esta estirpe (Liotenberg, 1995) encontrándose cuatro sitios de inicio, dos de ellos mayoritarios, denominados P₁ y P₂. Éstos se encuentran separados por 153 pb y podrían corresponder a los transcritos de 1,6 y 1,8 kb, respectivamente. Mientras que no se ha descrito cómo sería la estructura del promotor que da lugar a P₂, delante del sitio P₁ se localizan secuencias que pueden adaptarse perfectamente a las del promotor regulado por NtcA (Liotenberg, 1995), por lo que posiblemente su uso podría estar regulado por NtcA.

Como se ha discutido anteriormente los sitios de unión de NtcA en *Anabaena* sp. PCC 7120 tienen la misma secuencia que los de *Synechococcus* sp. PCC 7942. Esto es consistente con el hecho de que la secuencia del dominio hélice-giro-hélice de unión al DNA de la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 sea idéntica a la del de la proteína NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942. De todo lo anterior puede concluirse que la estructura de los promotores regulados por NtcA es idéntica en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en *Synechococcus* sp. PCC 7942.

El mutante CSE2 no desarrolla heterocistos y es incapaz de expresar el operón *nifHDK* o de incrementar los niveles del transcrito del gen *hetR* en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. La secuencia de la región de DNA delante del inicio de transcripción para el gen *nifH* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver Mulligan y Haselkorn, 1989) no muestra la estructura de un promotor regulado por NtcA. Sin embargo, se ha descrito que la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de unirse *in vitro*, aunque débilmente, a secuencias situadas delante del gen *nifH* (Chastain *et al.*, 1990; Ramasubramanian *et al.*, 1994). Ya que la expresión de *nifHDK* se circunscribe al heterocisto en condiciones de aerobiosis (Elhai y Wolk, 1990), y dado que el mutante CSE2 es incapaz de desarrollar heterocistos, NtcA no necesitaría interaccionar directamente con el promotor de *nifH* para regular su expresión, ya que podría hacerlo indirectamente regulando la expresión de algún gen de acción anterior necesario para el desarrollo de los heterocistos. La activación de la expresión del gen *hetR*, que tiene lugar en un momento muy temprano del desarrollo de los heterocistos, y que es esencial para dicho proceso (Black *et al.*, 1993), no se produce en el mutante CSE2. Sin embargo, delante de los inicios de transcripción de *hetR* tampoco existen secuencias que se aproximen al consenso de los promotores regulados por la proteína NtcA (W. J. Buikema, comunicación personal). Así pues, otro gen, inducido incluso antes que *hetR*, podría ser la diana directa de NtcA para la regulación del desarrollo de los heterocistos.

En conclusión, NtcA es un regulador global de la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. Además de su efecto positivo sobre la transcripción, NtcA también podría ejercer efectos represores tal y como ocurre con otros miembros de la familia Crp, por ejemplo sobre la expresión del operón *rbcLS* (que cifran la ribulosa bisfosfato carboxilasa) que se inactiva durante el desarrollo de los heterocistos (ver Ramasubramanian *et al.*, 1994).

Por otro lado, aunque tanto la asimilación de nitrato como la de dinitrógeno requieran el concurso de NtcA, el nitrato se asimila preferentemente sobre el dinitrógeno. No se sabe cómo se establece esta jerarquía, ni como el sistema de regulación de la transcripción mediado por NtcA se hace eco del estado nitrogenado celular. En *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver Tabla 9), al igual que en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Luque, 1994), la producción constitutiva de NtcA en estas estirpes no produce una expresión igualmente constitutiva de los genes regulados por dicha proteína, sino que esos genes siguen siendo reprimibles por amonio. Una posible explicación de estos hechos es que la proteína NtcA se regule a nivel de actividad en función del estado nitrogenado celular. Quizás diferentes grados de "activación" de la proteína NtcA de *Anabaena* sp., en conjunción con diferentes afinidades de ésta para los distintos promotores regulados, podrían proporcionar la variabilidad en la eficacia de unión a los mismos, lo cual se traduciría en su activación diferencial. Por último, el hecho de que existan genes relacionados con la asimilación de dinitrógeno, tales como *hetR* o *nifHDK*, que podrían regularse por NtcA de un modo indirecto podría sugerir que se requieren para la regulación de la asimilación de dinitrógeno otros factores transcripcionales, que activarían directamente a estos genes, y cuya expresión podría estar directamente regulada por NtcA.

5. CONCLUSIONES

1. Los genes *nir*, *nrtA*, *nrtB*, *nrtC*, *nrtD* y *narB* están implicados en la asimilación de nitrato por la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120.
2. La proteína NrtA de *Anabaena* sp. PCC 7120 está implicada en el transporte activo del nitrato al interior celular.
3. Los genes *nir*, *nrtA*, *nrtB*, *nrtC*, *nrtD* y *narB* se expresan en ausencia de amonio, con independencia de la presencia de nitrato en el medio de cultivo, desde un promotor situado delante del gen *nir* constituyendo una única unidad transcripcional (operón *nir*).
4. El gen *ntcA* está ampliamente distribuido y conservado entre las cianobacterias.
5. La proteína NtcA actúa como regulador de la expresión de genes regulados por nitrógeno en *Anabaena* sp. PCC 7120. El operón *nir* y el gen *glnA* presentan promotores regulados por NtcA.
6. La proteína NtcA controla el desarrollo de los heterocistos en un estadio muy temprano, anterior al de la expresión del gen *hetR*.
7. A diferencia de lo que ocurre en *Synechococcus* sp. PCC 7942, en *Anabaena* sp. PCC 7120 el gen *ntcA* se expresa a altos niveles en presencia de amonio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amman 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* **85**: 91-97.
- Andriesse X., van Arkel G. y Weisbeek P.** (1990) Cloning of the nitrate reductase gene of *Synechococcus* PCC 7942. Third Intl. Symp. on NO₃⁻ Assimilation: Molecular and Genetic Aspects. Bombanes, abstract pp. 98.
- Apte S. K. y Haselkorn R.** (1990) Cloning of salinity stress-induced genes from the salt-tolerant nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena toluosa*. *Plant Mol. Biol.* **15**: 723-733.
- Arizmendi J. M. y Serra J. L.** (1990) Purification and some properties of the nitrite reductase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1040**: 273-244.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl K. (eds)** (1994) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York.
- Bauer C. C., Scappino P. J. A. y Haselkorn R.** (1993) Growth of the cyanobacterium *Anabaena* on molecular nitrogen - *nifJ* is required when iron is limited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8812-8816.
- Bergmeyer H. U.** (1974) Methoden der enzymatischen Analyse, 2nd ed. Weinheim: Verlag Chemie.
- Birnboim H. C. y Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Black T. A. y Wolk C. P.** (1994) Analysis of a Het⁻ mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J. Bacteriol.* **176**: 2282-2292.
- Black T.A., Cai Y. y Wolk C. P.** (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* **9**: 77-84.
- Bogorad L.** (1975) Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* **188**: 891-898.

- Böhme H. y Haselkorn R.** (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 278-285.
- Bothe H.** (1982) Nitrogen fixation. En: *The Biology of Cyanobacteria* (Carr N. G. y Whytton B. A., eds.), pp. 87-104. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Boussiba S. y Gibson J.** (1987) Regulation of methylammonium/ammonium transport in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (PCC 7942). *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 289-293.
- Boussiba S., Dilling W. y Gibson J.** (1984) Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J. Bacteriol.* **160**: 204-210.
- Boyer H. W. y Roulland-Dussoix D.** (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Brahamsha B. y Haselkorn R.** (1991) Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**: 2442-2450
- Buick R.** (1992) The antiquity of oxigenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-dephicient archaean lakes. *Science.* **255**: 74-77.
- Buikema W. J. y Haselkorn R.** (1991) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene Dev.* **5**: 321-330.
- Buikema W. J. y Haselkorn R.** (1993) Molecular genetics of cyanobacterial development. *Annu. Rev. Plant Phisiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 33-52.
- Cai Y. y Wolk C. P.** (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.
- Candau P.** (1979) Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Carrasco C. D., Ramaswamy K. S., Ramasubramaniam T. S. y Golden J. W.** (1994) *Anabaena-xisF* gene encodes a developmentally regulated site-specific recombinase. *Genes Develop.* **8**: 74-83.

Carrasco C. D., Buettner J.A. y Golden J. W. (1995) Programed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 791-795.

Cawse, P. (1967) The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* **92**: 311-315.

Chastain C. J., Brusca J. S., Ramasubramanian T. S., Wei T.-F. y Golden J. W. (1990) A sequence-specific DNA-binding factor (VF1) from *Anabaena* sp. PCC 7120 vegetative cells binds to three adjacent sites in the *xisA* upstream region. *J. Bacteriol.* **172**: 5044-5051.

Devereux J. P., Haerberli P. y Smithies O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387-395.

Dobrogosz W. J. (1981) Enzymatic activity. En *Manual of methods for general bacteriology* (Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. y Phillips, G. B., eds), pag. 365-392. American Society for Microbiology, Washington D. C.

Douglas S. E. y Turner S. (1991) Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J. Mol. Evol.* **33**: 267-273.

Elhai J. (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**: 179-184.

Elhai J. y Wolk, C. P. (1988a) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138.

Elhai J. y Wolk, C. P. (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**: 747-755.

Elhai J. y Wolk, C. P. (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO. J.* **9**: 3379-3388.

Elhai J., Cai Y. y Wolk C. P. (1994) Conduction of pEC22, a plasmid coding for MR.*EcoT221*, mediated by a resident Tn3-like transposon, Tn5396. *J. Bacteriol.* **176**: 5059-5067.



Elmorjani K., Liotenberg S., Houmard J. y Tandeau de Marsac N. (1992) Molecular characterization of the gene encoding glutamine synthetase in the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 1296-1302.

Fellay R., Perret X., Viprey V., Broughton W. J. y Brenner S. (1995) Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* **16**: 657-667.

Fernández-Piñas F., Leganés F. y Wolk C. P. (1994) Characterization of the gene *hetP*, insertional mutagenesis of which prevents *Anabaena* sp. PCC 7120 from forming heterocysts. *J. Bacteriol.* **12**: 679-684.

Fisher E., Tuli R. y Haselkorn R. (1981) A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylylated. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 3393-3397.

Florencio F. J. y Ramos J. L. (1985) Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **838**: 39-48.

Flores E. y Herrero A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A. ed.) pp. 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Flores E., Guerrero M. G. y Losada M. (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **128**: 137-144.

Flores E., Guerrero M. G. y Losada M. (1983a) Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **722**: 408-416.

Flores E., Romero J. M., Guerrero M. G. y Losada M. (1983b) Regulatory interaction of photosynthetic nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **725**: 529-532.

Flores E., Herrero A. y Guerrero M. G. (1987) Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **896**: 103-108.

- Floriano B., Herrero A. y Flores E.** (1994) Analysis of expression of the *argC* and *argD* genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **176**: 6397-6401.
- Forchhammer K. y Tandeau de Marsac N.** (1994) The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* **176**: 84-91
- Forchhammer K. y Tandeau de Marsac N.** (1995a) Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **177**: 2033-2040.
- Forchhammer K. y Tandeau de Marsac N.** (1995b) Phosphorylation of the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Analysis of *in vitro* kinase activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5812-5817.
- Giovannoni S. J., Turner S., Olsen G. J., Barns S., Lane D. J. y Pace N. R.** (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**: 3584-3592.
- Golden J. W. y Wiest D. R.** (1988) Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene. *Science* **242**: 1421-1423.
- Golden J. W., Robinson S. J. y Haselkorn R.** (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* **314**: 419-423.
- Golden J. W., Mulligan M. E. y Haselkorn R.** (1987) Different recombination site specificity of two developmentally regulated genome rearrangements. *Nature* **327**: 526-529.
- Golden J. W., Carrasco C. D., Mulligan M. E., Schneider G. J. y Haselkorn R.** (1988) Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **170**: 5034-5041.
- Golden S. S., Brusslan J. y Haselkorn R.** (1987) Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol.* **153**: 215-231.
- Goldman B. S., Lin J. T. y Stewart V.** (1994) Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA*

- (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J. Bacteriol.* **176**: 5077-5085.
- Gray M. W.** (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends. Gen.* **5**: 294-299.
- Hanahan, D.** (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Haselkorn R.** (1992) Developmentally regulated gene rearrangements in prokaryotes. *Ann. Rev. Genet.* **26**: 111-128.
- Haselkorn R. y Buikema W. J.** (1992) Nitrogen fixation in cyanobacteria. En: Stacey G., Burris R. H. y Evans H. J. (eds) Biological Nitrogen Fixation, pp 166-190. Chapman y Hall, New York.
- Haselkorn R., Rice D., Curtis S. E. y Robinson S. J.** (1983) Organization and transcription of genes important in *Anabaena* heterocyst differentiation. *Ann. Microbiol* (Ins. Pasteur) **134B**: 181-193.
- Hattori A. y Uesugi I.** (1968) Purification and properties of nitrite reductase from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* **9**: 689-699.
- Herrero A. y Guerrero M. G.** (1986) Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2463-2468.
- Herrero A. y Wolk P.** (1986) Genetic mapping of the chromosome of the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. Proximity of the structural genes for nitrogenase and ribulose biphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **261**: 7748-7754.
- Herrero A., Flores E. y Guerrero M. G.** (1981) Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. *J. Bacteriol.* **145**: 175-180.
- Herrero A., Flores E. y Guerrero M. G.** (1984) Regulation of the nitrate reductase level in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*: activity decay under nitrogen stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **234**: 454-459.
- Herrero A., Flores E. y Guerrero M. G.** (1985) Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 21-25.
- Holmes D. S. y Quigley M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.

Jüttner F. (1983) ^{14}C -labelled metabolites in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena cylindrica* filaments and their presumptive function as transport vehicles of organic carbon and nitrogen. *J. Bacteriol.* **155**: 628-633.

Kaneko T., Tanaka A., Sato S., Kotani H., Sazuka T., Miyajima N., Sugiura M. y Tabata S. (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* **2**: 153-166.

Khudyakov I. y Wolk C. P. (1994) A transposon insertion in *hetC*, a gene encoding a protein similar to bacterial ABC protein exporters, prevents heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120. Abstr. 8th Intl. Symp. Phototrophic Prok, Urbino

Kuhlemeier C. J., Logtenberg T., Stoorvogel W., van Heugten H. A. A., Borrias W. E. y van Arkel G. A. (1984a) Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **159**:36-41.

Kuhlemeier C. J., Teeuwsen V. J. P., Janssen M. J. T. y van Arkel G. A. (1984b) Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using a shuttle gene library. *Gene* **31**:109-116.

Lammers P. J. y Haselkorn R. (1983) Sequence of the *nifD* gene coding for the α subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4723-4727.

Lammers P. J., Golden J. W. y Haselkorn R. (1986) Identification and sequence of a gene required for a developmentally regulated DNA excision in *Anabaena*. *Cell* **44**: 905-911.

Lammers P. J., McLaughlin S., Papin S., Trujillo-Provencio C. y Ryncarz A. J. (1990) Developmental rearrangement of cyanobacterial *nif* genes: nucleotide sequence, open reading frames, and cytochrome P-450 homology of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *nifD* element. *J. Bacteriol.* **172**: 6981-6990.

Leganés F., Fernández-Piñas F. y Wolk C. P. (1994) Two mutations that block heterocyst differentiation have different effects on akinete differentiation in *Nostoc ellisporum*. *Mol. Microbiol.* **12**: 679-684.

Liang J., Scappino L. y Haselkorn R. (1992) The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5655-5659.

- Lin, J. T., Goldman, B. S. y Stewart, V. (1993)** Structures of genes *nas A* and *nasB* encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5aI. *J. Bacteriol.* **175**: 2370-2378.
- Lin, J. T., Goldman, B. S. y Stewart, V. (1994)** The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5aI. *J. Bacteriol.* **176**: 2551-2559.
- Liottenberg S. (1995)** Relations entre l'assimilation de l'azote et la photosynthèse chez les cyanobactéries du genre *Calothrix*. Tesis Doctoral. Universidad de París VII Denis Diderot.
- Lowe D. J., Thorneley R. N. F. y Smith B. E. (1985)** Nitrogenase: En: *Metalloproteins*, Part I (Harrison P. M., ed.), pp. 207-249. Verlag Chemie, Weinheim.
- 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.
- Luque I. (1994)** Estructura genética del sistema de asimilación de nitrato y regulación global d la asimilación de nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus* sp.. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Luque I., Herrero A., Flores E. y Madueño F. (1992)** Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol. Gen. Genet.* **232**: 7-11.
- Luque I., Flores E. y Herrero A. (1993)** Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant. Mol. Biol.* **21**: 1201-1205.
- Luque I., Flores E. y Herrero A. (1994a)** Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *Embo J.* **13**: 2862-2869.
- Luque I., Flores E. y Herrero A. (1994b)** Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**: 296-298.
- MacKinney G. (1941)** Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**: 315-322.

Madueño F., Flores E. y Guerrero M. G. (1987) Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **896**: 109-112.

Madueño F., Borrias W. E., van Arkel G. A. y Guerrero M. G. (1988a) Isolation and characterization of *Anacystis nidulans* R2 mutants affected in nitrate assimilation: establishment of two new mutant types. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 223-228.

Madueño F., Vega-Palas M. A., Flores E. y Herrero A. (1988b) A cytoplasmic-membrane protein repressible by ammonium in *Synechococcus* R2: altered expression in nitrate-assimilation mutants. *FEBS Lett.* **239**: 289-291.

Maldener I., Fiedler G., Ernst A., Fernández-Piñas F. y Wolk C.P. (1994) Characterization of *devA*, a gene required for the maturation of proheterocysts in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Bacteriol.* **176**: 7543-7549.

Manzano C. (1977) La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde azulada *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

Manzano C., Candau P., Gómez-Moreno C., Relimpio A. M. y Losada M. (1976) Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans* *Mol. Cell. Biochem.* **10**: 161-169.

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.

Marqués S., Florencio F. J. y Candau P. (1992) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* **206**: 69-77.

Martín-Nieto J., Herrero A. y Flores E. (1989) Regulation of nitrate and nitrite reductases in dinitrogen-fixing cyanobacteria and *Nif*⁻ mutants. *Arch. Microbiol.* **151**: 475-478.

Martín-Nieto J., Flores E. y Herrero A. (1990) Mutants of *Anabaena variabilis* requiring high levels of molybdate for nitrate reductase and nitrogenase activities. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 1-4.

Martín-Nieto J., Herrero A. y Flores E. (1991) Control of nitrogenase mRNA levels by products of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Physiol.* **97**: 825-828.

Martín-Nieto J., Flores E. y Herrero A. (1992) Biphasic kinetic behavior of nitrate reductase from heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacteria. *Plant Physiol.* **100**: 157-163.

Matveyev A.V., Rutgers R., Söderbäck E. y Bergman B. (1994) A novel genome rearrangement involved in heterocyst differentiation of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 201-208.

Mazodier P., Cossart P., Giraud E. y Gasser F. (1985) Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acids Res.* **13**: 195-205.

Mazur B. J., Rice D. y Haselkorn R. (1980) Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 186-190.

Meeks J. C., Wolk C. P., Thomas J., Lockau W., Shaffer P. W., Austin S. M., Chien W. S. y Galonsky A. (1977) The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* **252**: 7894-7900.

Meeks J. C., Wylcoff K. L., Chapman, J. S. y Enderlin, C. S. (1983) Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *Appl. Environm. Microbiol.* **45**: 1351-1359.

Méndez J. M. y Vega J. M. (1981) Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Physiol. Plant.* **52**: 7-14.

Méndez J. M., Herrero A. y Vega J. M. (1981) Characterization and catalytic properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Z. Pflanzenphysiol.* **103**: 305-315.

Merchán F., Kindle K. L., Llama M. J., Serra J. L. y Fernández E. (1995a) Cloning and sequencing of the nitrate transport system from the thermophilic, filamentous cyanobacterium *Phormidium laminosum*: comparative analysis with the homologous system from *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol. Biol.* **28**: 759-766.

Merchán F., Prieto R., Kindle K. L., Llama M. J., Serra J. L. y Fernández E. (1995b) Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli* of the nitrite reductase gene from the filamentous, thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1037-1042.

- Mérida A., Leurentop L., Candau P. y Florencio F. J. (1990) Purification and properties of glutamine synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J. Bacteriol.* **172**: 4732-4735.
- Mérida A., Candau P. y Florencio F. J. (1991) *In vitro* reactivation of *in vivo* ammonium-inactivated glutamine synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 780-786.
- Mérida A., Flores E. y Florencio F. J. (1992) Regulation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 glutamine synthetase activity in a *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 derivative strain bearing the *Anabaena glnA* gene and a mutated host *glnA* gene. *J. Bacteriol.* **174**: 650-654.
- Mikami B. e Ida S. (1984) Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Biochim. Biophys. Acta* **791**, 294-304.
- Miyaji T. y Tamura G. (1992) Isolation and partial characterization of homogeneous nitrite reductase from a cyanobacterium, *Aphanothece sacrum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1333-1334.
- Mulligan M. E. y Haselkorn R. (1989) Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB-fdxN-nifS-nifU* operon. *J. Biol. Chem.* **264**: 19200-19207.
- Murray N. E., Brammar W. J. y Murray K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**: 53-56.
- Navarro, F. (1996) Estudio de las glutamato sintasas de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Navarro, F., Chávez, S., Candau, P. y Florencio F. J. (1994) Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. *Plant Mol. Biol.* **27**: 753-767.
- Ohmori M., Ohmori, K. y Strotman, H. (1977) Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **114**: 225-229.
- Omata T. (1991) Cloning and characterization of the *nrtA* gene that encodes a 45 kDa protein involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **32**: 151-157.

- Omata T.** (1995) Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **36**: 207-213.
- Omata T., Ohmori, M., Arai, N. y Ogawa, T.** (1989) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6612-6616.
- Omata T., Andriesse X. y Hirano A.** (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 193-202.
- Orr J. y Haselkorn R.** (1981) Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **256**: 13099-13104.
- Orr J., Keefer L. M., Keim P., Nguyen T. D., Wellems T., Heinrichson L. y Haselkorn R.** (1981) Purification, physical characterization, and NH₂-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **256**: 13091-13098.
- Ortega T., Castillo F. y Cárdenas J.** (1976) Photolysis of water coupled to nitrate reduction by *Nostoc muscorum* subcellular particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**: 885-891.
- Ostrowski J., Wu J-Y., Rueger D. C., Miller B. E., Siegel L. M. y Kredich M.** (1989) Characterization of the *cyaJIIH* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **264**: 15726-15737.
- Pederson D. M., Daday A. y Smith G. D.** (1986) The use of nickel to probe the role of hydrogen metabolism in cyanobacterial nitrogen fixation. *Biochimie* **68**: 113-120.
- Petersen, C.** (1992) Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanism of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. *Mol. Microbiol.* **6**: 277-282.
- Potts M., Angeloni S. V., Ebel R. E. y Bassam D.** (1992) Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* **256**: 1690-1692.
- Prentki P. y Krisch H. M.** (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Rai A. N., Rowell P. y Stewart W .D. P.** (1984) Evidence for an ammonium transport system in free-living and symbiotic cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **137**: 241-246.

Ramasubramaniam T. S., Wei T-F. y Golden J. W. (1994) Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J. Bacteriol.* **176**: 1214-1223.

Ramasubramaniam T. S., Wei T-F., Oldham A. K. y Golden J. W. (1996) Transcription of the *Anabaena* sp. PCC strain PCC 7120 *ntcA* gene: multiple transcripts and NtcA binding. *J. Bacteriol.* **178**: 922-926.

Ramos J. L. y Guerrero M. G. (1983) Involvement of ammonium metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. *Arch. Microbiol.* **136**: 81-83.

Ramos J. L., Madueño F. y Guerrero M. G. (1985) Regulation of nitrogenase levels in *Anabaena* sp. ATCC 33047 and other filamentous cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **141**: 105-111.

Record. M. T.(Jr), Reznicoff W. S., Craig M. L., McQuade K. L. y Schlax P. J. (1996) *Escherichia coli* RNA polimerase (Es70), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. En: *Escherichia coli and Salmonella* (Neidhardt F. C. editor jefe) pp. 792-820. ASM Press, Washington, D. C.

Reich S., Almon H. y Böger P. (1986) Short-term effect of ammonia on nitrogenase activity of *Anabaena variabilis* (ATCC 29413). *FEMS Microbiol. Let.* **34**: 53-56.

Reitzer L. J. y Magasanik B. (1987) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En *Escherichia coli and Salmonella thyphimurium. Cellular and Molecular Biology.* (Neithardt, F. C. ed) pag. 302-321. American Society for Microbiology, Washington.

Reyes J. C. y Florencio F. J. (1994) A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **176**: 1260-1267.

Rice D., Mazur B. J. y Haselkorn R. (1982) Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **257**: 13157-13163.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M. y Stanier R. Y. (1979) Genetic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.

- Rodríguez R., Lara C. y Guerrero M.G. (1992) Nitrate transporte in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem. J.* **282**: 639-643.
- Rubio L. M., Flores E. y Herrero A. (1996a) The *nara* locus of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 consists of a cluster of molybdopterin-biosynthesis genes. Base de datos EMBL/GenBank/DDBJ nº acceso X99625.
- Rubio L. M., Herrero A. y Flores E. (1996b) A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Mol. Biol.* **30**: 845-850.
- Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampaio M. J. A. M., Rowell P. y Stewart W. D. P. (1979) Purification and some properties of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and a *Nostoc* sp. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 181-191.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **74**, 5463-5467.
- Schneider G. J., Tumer N. E., Richaud C., Borbely G. y Haselkorn R. (1987) Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **262**: 14633-14639.
- Schneider G. J., Lang J. D. y Haselkorn R. (1991) Promoter recognition by the RNA polymerase from vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene* **105**: 51-60.
- Schrautemeier B. y Böhme H. (1985) A distinct ferredoxin for nitrogen fixation from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett.* **184**: 304-308.
- Schrautemeier B. y Böhme H. (1992) Coding sequence of a heterocyst ferredoxin gene (*fdxH*) isolated from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601. *Plant. Mol. Biol.* **18**: 1005-1006.
- Schrautemeier B., Cassing A. y Böhme H. (1994) Characterization of the genome region encoding a FdxH-type ferredoxin and a new 2[4Fe4S] ferredoxin from the nonheterocystous, nitrogen fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* PCC 73110. *J. Bacteriol.* **176**:1037-1046.

Schrautemeier B., Neveling U. y Schmitz S. (1995) Distint and differently regulated Mo-dependent nitrogen-fixing systems evolved for heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: characterization of the *fdxH1/2* gene regions as part of the *nif1/2* gene clusters. *Mol. Microbiol.* **18**: 357-369.

Shapiro B. M. y Stadtman E. R. (1970) Glutamine synthetase (*E. coli*). *Methods Enzymol.* **17A**: 910-922.

Sivak M. N., Lara C., Romero J. M., Rodríguez R. y Guerrero M. G. (1989) Relationship between a 47 kDa cytoplasmic membrane polypeptide and nitrate transport in *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**: 257-262.

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.

Snell F. D. y Snell C. T. (1949) Colorimetric methods of analysis. Vol. 3, pag 804-805. Van Nostrand, Nueva York.

Stanier R. Y. y Cohen-Bazire G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 225-274.

Stevens S. E. y van Baalen C. (1974) Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effects of inhibitors, blue light, and ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**: 146-152.

Stewart W. D. P. (1980) Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 497-536.

Stewart W. D. P. y Rowell P. (1975) Effects of L-methionine-DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 846-856.

Stewart W. D. P., Fitzgerald G. P. y Burris R. H. (1967) *In situ* studies on nitrogen fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**: 2071-2078.

Suzuki I., Sugiyama T. y Omata T. (1993) Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **34**: 1311-1320.

Suzuki I., Horie N., Sugiyama T. y Omata T. (1995a) Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. *J. Bacteriol.* **177**: 290-296.

Suzuki I., Kikuchi H., Nakanishi S., Fujita Y., Sugiyama T. y Omata T. (1995b) A novel nitrite reductase gene from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *J. Bacteriol.* **177**: 6137-6143.

Tandeau de Marsac N., Forchhammer K., Liotenberg S., Campbell D., Castets A-M., Flores E. y Houmard J. (1995) The P_{II} protein: a central node for the coordination of N and C assimilation in cyanobacteria. Third European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. p. 45.

Tandeau de Marsac N. y Houmard J. (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 119-190.

Thiel T. (1993) Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 6276-6286.

Thiel T., Lyons E. M., Erker J. C. y Ernst A. (1995) A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9358-9362.

Tischner R. y Schmidt A. (1984) Light mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. *Arch. Microbiol.* **137**: 151-154.

Tumer N. E., Robinson S. J. y Haselkorn R. (1983) Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* **306**: 337-342.

Vega-Palas M. A., Madueño F., Herrero A. y Flores E. (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **172**: 643-647.

Vega-Palas M. A., Flores E. y Herrero A. (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* **6**: 1853-1859.

- Wagner S. J., Thomas S. P., Kaufman R. I., Nixon B. T. y Stevens S. E. (1993) The *glnA* gene of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 is nonessential for ammonium assimilation. *J. Bacteriol.* **175**: 604-612.
- Wei T.-F., Ramasubramanian T. S., Pu F. y Golden J. W. (1993) *Anabaena* sp. PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by *in vivo* transcriptional interference selection. *J. Bacteriol.* **175**: 4025-4035.
- Wei T.-F., Ramasubramanian T. S. y Golden J. W. (1994) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* required for growth on nitrate and heterocyst development. *J. Bacteriol.* **176**: 4473-4482.
- Wertman K. F., Wyman A. R. y Botstein D. (1986) Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* **49**: 253-262.
- Woese C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Wolk C. P. (1980) Cyanobacteria (blue-green algae). En *The Biochemistry of Plants*. Vol. 1, pag. 659-687. Academic Press Inc.
- 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. (1989) Alternative models for the development of the pattern of spaced heterocysts in *Anabaena* (*Cyanophyta*). *Pl. Syst. Evol.* **164**: 27-31.
- Wolk C. P., Austin S.M., Bortins J. y Galonsky A. (1974) Autoradiographic localization of ¹³N after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by a heterocyst-forming blue-green alga. *J. Cell. Biol.* **61**: 440-453.
- 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.* **81**: 1561-1565.
- Wolk C. P., Cai Y., Cardemil L., Flores E., Hohn B., Murry M., Schmetterer G., Schrautemeier B. y Wilson R. (1988) Isolation and characterization of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.* **170**: 1239-1244.
- Wolk C. P., Ernst A. y Elhai J. (1994) Heterocyst Metabolism and Development. En: *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D. A. ed.) pp. 769-823. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Zhang X., Tabita F. R. y Van Baalen C. (1984) Nickel control of hydrogen production and uptake in *Anabaena* spp. strains CA and 1F. *Gen. Microbiol.* **130**: 1815-1818.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Excmo. Consejo de la Universidad de Sevilla el día de la fecha, se acordó por los abajo firmantes el otorgar el título de Doctor en Ciencias Exactas y Naturales a

EL C. JOSÉ ENRIQUE FRIAS SÁNCHEZ
por su Tesis Doctoral de REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN LA CIANOBACTERIA FORMADORA DE HETEROCISTOS Anabaena sp. PCC 7120

con el fin de otorgarle la categoría de ARTO CUM LAUDE

Sevilla, 28 de NOVIEMBRE de 1996

El Vocal,

M. Luisa Peleato

El Vocal,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]



500846003

FBI E TD / 359