

Queda registrada esta tesis doctoral en el
al folio 203 número 170
correspondiente a
Sevilla, _____

TD/245

Rosa Caffre

TRANSPORTE DE NITRATO EN LA CIANOBACTERIA

Anacystis nidulans

Trabajo presentado por la Licenciada M^a del Rocío Rodríguez
Sánchez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Rocío Rodríguez

Sevilla, 1993

Directora de la Tesis

Catalina Lara

Dra. Catalina Lara Coronado

Profesora Titular de Bioquímica y Biología

Molecular

B. 11706



TD

245

A Juan Manuel

A mis padres

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC) de Sevilla.

Deseo expresar mi agradecimiento más sincero a la Dra. Catalina Lara Coronado, directora de esta Tesis, por su gran dedicación e interés en el transcurso de este trabajo y por su contribución a mi formación científica. Al Dr. Miguel García Guerrero le agradezco su apoyo constante y la aportación de ideas para mi trabajo. A ambos les agradezco, además, el trato amable y cariñoso que me han dispensado, gracias al cual he terminado la Tesis que un día decidí abandonar.

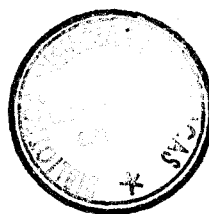
A los Dres. Mirta Sivak, Jose M^a Romero y Mercedes García González les agradezco su participación en la obtención de algunos de los resultados presentados en este trabajo.

Agradezco al Dr. Francisco Madueño el regalo de la estirpe obtenida por él, *A. nidulans* R2 FM6, sin la cual estoy convencida que este trabajo no hubiese llegado a puerto. Al Dr. Tatsuo Omata le agradezco también su regalo de la estirpe *A. nidulans* R2 M45.

A Tomás Coronil, Mercedes García González, Begoña Delgado, Alicia Muro, Angel Mérida y Belén Floriano, les agradezco el que hayan soportado estóicamente durante los años que hemos compartido, siempre han estado junto a mí en los mejores momentos y en los más difíciles. Al resto de compañeros de este departamento, el que me hayan hecho agradable mi paso por el centro.

Agradezco profundamente a Juan Manuel, su cariño, su ayuda y la fé que siempre ha tenido en mí incluso en los momentos en que yo no la tenía, que han sido fundamentales para que se terminara este trabajo. A Ana y Guillermo, su amistad.

Por último, agradezco a la Junta de Andalucía el que me concediera una Beca que me ha permitido subsistir durante parte del tiempo que ha durado este trabajo y a la Dra. Catalina Lara por proporcionarme otra Beca, con cargo a fondos del grupo de investigación Fotosíntesis del que es Investigadora Responsable, durante dos años.



INDICE

<i>Abreviaturas</i>	V
<i>Indice de esquemas</i>	VIII
<i>Indice de figuras</i>	IX
<i>Indice de tablas</i>	XII
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	13
2.1. Organismos y condiciones de cultivo	14
2.1.1. Estirpes empleadas	14
2.1.2. Medios y condiciones de cultivo	16
2.1.3. Recogida de células	18
2.1.4. Conservación de las cepas cianobacterianas	19
2.1.5. Tests de contaminación de las estirpes cianobacterianas	20
2.2. Preparación de membranas plasmáticas	21
2.3. Ensayos biológicos en células intactas	26
2.3.1. Ensayo de transporte de nitrato	26
2.3.2. Ensayo de consumo de nitrato	29
2.3.3. Determinación del desprendimiento de O ₂ dependiente de CO ₂	29

2.3.4. Tratamiento con inhibidores	30
2.4. Ensayos biológicos en fracciones celulares	32
2.4.1. Fosforilación de polipéptidos de membrana plasmática con ^{32}P -ATP	32
2.4.2. Determinación de actividad fosfatasa en la fracción soluble celular	33
2.5. Métodos analíticos	34
2.5.1. Análisis cuantitativo de nitrato	34
2.5.1.1. Determinación de nitrato por CLAE de intercambio aniónico con detección espectrofotométrica	34
2.5.1.2. Determinación espectrofotométrica de nitrato	38
2.5.2. Análisis electroforético de las preparaciones de membranas plasmáticas en condiciones desnaturalizantes	38
2.5.2.1. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida	38
2.5.2.2. Tinción de proteínas en geles de poliactilamida	41
2.5.2.3. Secado de geles de poliactilamida	41

2.5.2.4. Detección de proteínas marcadas en geles de SDS-poliacrilamida mediante autorradiografía	42
2.5.3. Marcaje "in vitro" de polipéptidos con ^{14}C -PGO	43
2.5.4. Determinación de clorofila <i>a</i>	43
2.5.5. Determinación de proteínas	44
2.5.6. Técnicas espectrofotométricas	44
2.5.7. Medidas de pH	45
2.5.8. Medidas de flujos gaseosos	45
2.6. Reactivos	46
3. RESULTADOS	47
3.1. Características cinéticas y bioenergéticas del transporte de nitrato en <i>Anacystis nidulans</i> R2 FM6	48
3.1.1. Transporte de nitrato en <i>Anacystis nidulans</i> R2 y en la estirpe mutante <i>Anacystis nidulans</i> R2 FM6	48
3.1.2. Termodinámica del transporte de nitrato	52
3.1.3. Requerimiento por sodio del transporte de nitrato	55
3.1.4. Análisis cinético del transporte de nitrato	61
3.1.5. Inhibición por nitrito del transporte de nitrato	67
3.1.6. Efecto del K^+ sobre el transporte de nitrato	70
3.1.7. Transporte de nitrato en presencia de clorato	72
3.1.8. Otros inhibidores del transporte de nitrato	74

3.1.8.1. Inhibición reversible por <i>orto</i> -nitrobenzaldehido	74
3.1.8.2. Inhibición irreversible por fenilglioxal	78
3.2. Regulación del transporte de nitrato por la fuente de nitrógeno	83
3.2.1. Inhibición por amonio del transporte de nitrato en la estirpe <i>Anacystis nidulans</i> R2 FM6	83
3.2.2. Represión por amonio del transporte de nitrato en <i>Anacystis nidulans</i>	88
3.3. Correlación entre la capacidad de transporte de nitrato y la presencia de un polipéptido de 47 kDa en la membrana plasmática de <i>A. nidulans</i>	93
3.4. Comparación del perfil electroforético de la membrana plasmática de <i>A. nidulans</i> R2 y la estirpe FM6	105
3.5. Marcaje "in vitro" de membranas plasmáticas de <i>A. nidulans</i> con ¹⁴ C-PGO	107
3.6. Fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática en <i>A. nidulans</i>	109
4. DISCUSION	120
5. CONCLUSIONES	141
6. BIBLIOGRAFIA	144

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
ATPasa	ATP-fosfohidrolasa
Cl	Clorofila
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
$\Delta G'$	Cambio de energía libre
$\Delta \phi$	Potencial de membrana
$\Delta \mu_x$	gradiente electroquímico de un ión x
DLG	D,L-gliceraldehido
E	Einstein (mol de fotones)
<i>E</i>	Coefficiente de extinción
E_a	Energía de activación
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
F	Constante de Faraday
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
I_{50}	Concentración de un compuesto a la que se produce un 50% de inhibición de una actividad biológica
K_i	Constante de disociación de un complejo enzima-inhibidor
K_m	Constante de Michaelis-Menten

K _s	Constante de disociación de un complejo enzima-sustrato
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
NAD(P)H	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (fosfato), forma reducida
NMR	Resonancia magnética nuclear
ONB	<i>orto</i> -nitrobenzaldehido
p/v	peso/volumen
PCC	Colección de cultivos del Instituto Pasteur (Francia)
PGO	Fenilglioxal
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
Q ₁₀	valor por el que se multiplica la velocidad de una reacción al aumentar la temperatura 10 °C
R	Constante de los gases
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Temperatura absoluta
t ^a	Temperatura
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
TES	Acido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
u.r.	Unidades relativas
U.V.	Ultravioleta

v	velocidad
v / v	volumen/volumen
Vis	Visible
z	carga de un ión

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparación del gradiente discontinuo de sacarosa en tubos de polialómero para la purificación de membranas plasmáticas de <i>A. nidulans</i>	23
Esquema 2. Procedimiento de centrifugación de las células a través de silicona	27
Esquema 3. Modelo propuesto para el transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i>	126

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las diferentes fracciones celulares en función de sus densidades, a lo largo del gradiente de sacarosa	24
Figura 2. Cromatograma de CLAE de intercambio aniónico de un extracto ácido de células de <i>A. nidulans</i> centrifugadas a través de sílica	36
Figura 3. Recta de calibrado para la determinación de nitrato por CLAE de intercambio aniónico	37
Figura 4. Acumulación intracelular de nitrato en células de la estirpe silvestre <i>A. nidulans</i> R2 y de la estirpe mutante FM6 ensayadas en condiciones de iluminación	50
Figura 5. Acumulación intracelular de nitrato en células de <i>A. nidulans</i> R2 y en la estirpe FM6 ensayadas en oscuridad	51
Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en células de <i>A. nidulans</i> R2 FM6	54
Figura 7. Dependencia por sodio del transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	56
Figura 8. Inhibición por monensina de la acumulación intracelular de nitrato en células de <i>A. nidulans</i> R2 FM6	57
Figura 9. Estimulación por amiloride del transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	60
Figura 10. Dependencia de la velocidad inicial de transporte de nitrato respecto a la concentración externa de nitrato en <i>A. nidulans</i> FM6 R2 en condiciones de iluminación	62
Figura 11. Dependencia de la velocidad inicial de transporte de nitrato con respecto a la concentración externa de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6 a distintas concentraciones de sodio	64
Figura 12. Efecto de la concentración externa de sodio sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6 a diferentes concentraciones de nitrato	66

Figura 13. Inhibición por nitrito de la velocidad inicial del transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6 en condiciones de iluminación	68
Figura 14. Dependencia de la acumulación intracelular de nitrato con respecto a la concentración de nitrito en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	69
Figura 15. Efecto de la concentración externa de potasio sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6 a distintas concentraciones de sodio	71
Figura 16. Efecto del clorato sobre el transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	73
Figura 17. Efecto del ONB sobre el consumo de nitrato en <i>A. nidulans</i>	75
Figura 18. Inhibición por ONB del transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	77
Figura 19. Inhibición del transporte de nitrato por PGO en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	79
Figura 20. Inhibición por amonio del transporte de nitrato en células de <i>A. nidulans</i> R2 FM6 y prevención del efecto por tratamiento con MSX	84
Figura 21. Reversión de la inhibición por amonio del transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	86
Figura 22. Dependencia de la acumulación intracelular de nitrato con respecto a la concentración de amonio añadido en células de <i>A. nidulans</i> R2 FM6	87
Figura 23. Composición polipeptídica de la membrana plasmática de <i>A. nidulans</i>	94
Figura 24. Determinación del peso molecular del polipéptido presente en la membrana plasmática de células de <i>A. nidulans</i> cuya cantidad varía considerablemente en función de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo	95
Figura 25. Influencia de la fuente de nitrógeno en la composición	

polipeptídica de la membrana plasmática de <i>A. nidulans</i>	97
Figura 26. Efecto del cloranfenicol sobre la composición polipeptídica de la membrana plasmática de <i>A. nidulans</i> tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato	98
Figura 27. Evolución con respecto al tiempo de la abundancia del polipéptido de 47 kDa tras la transferencia a medio con nitrato de células de <i>A. nidulans</i> cultivadas con amonio	99
Figura 28. Acumulación intracelular de nitrato en células de <i>A. nidulans</i> R2 y de la estirpe mutante M45	102
Figura 29. Comparación del perfil electroforético de proteínas de membrana plasmática de <i>A. nidulans</i> R2 y de la estirpe mutante M45	104
Figura 30. Composición polipeptídica de la membrana plasmática de la estirpe FM6. Comparación con su estirpe silvestre	106
Figura 31. Marcaje "in vitro" con ^{14}C -PGO de preparaciones de membrana plasmática de células de <i>A. nidulans</i>	108
Figura 32. Marcaje "in vitro" con γ - ^{32}P -ATP de proteínas de membrana plasmática en células de <i>A. nidulans</i> cultivadas con nitrato	111
Figura 33. Fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática en células de <i>A. nidulans</i>	112
Figura 34. Pérdida de la capacidad de fosforilación "in vitro" en preparaciones de membrana plasmática hervidas de células de <i>A. nidulans</i>	114
Figura 35. Dependencia por Mg^{2+} de la fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática de <i>A. nidulans</i>	115
Figura 36. Pérdida de la capacidad de fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática de <i>A. nidulans</i> tras someter las células a "shock" de amonio	117

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Estirpes utilizadas y particularidades de las condiciones de crecimiento	15
Tabla II. Reversibilidad del efecto inhibitor del ONB sobre el consumo de nitrato en células de <i>A. nidulans</i>	76
Tabla III. Irreversibilidad del efecto del PGO sobre el transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> R2 FM6	81
Tabla IV. Efecto del PGO sobre la producción fotosintética de O ₂ dependiente de CO ₂ en <i>A. nidulans</i>	82
Tabla V. Transporte de nitrato en oscuridad en <i>A. nidulans</i> en función de la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento de las células	89
Tabla VI. Desarrollo de la actividad de transporte de nitrato en oscuridad en células de <i>A. nidulans</i> cultivadas con amonio y transferidas a medios con diferentes fuentes de nitrógeno	90
Tabla VII. Efecto del cloranfenicol sobre el desarrollo de la actividad de transporte de nitrato en <i>A. nidulans</i> tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato	92
Tabla VIII. Evolución de la capacidad de transporte de nitrato y de la cantidad del polipéptido de 47 kDa en <i>A. nidulans</i> , tras la transferencia a medio con nitrato de células cultivadas con amonio	100
Tabla IX. Actividad fosfatasa alcalina en la fracción soluble de células de <i>A. nidulans</i> cultivadas con nitrato y de las sometidas a "shock"	118

1. INTRODUCCION

El nitrato es la fuente de nitrógeno más abundante en la naturaleza y la utilizada mayoritariamente por los organismos fotosintéticos. La asimilación primaria de nitrato comprende tres fases: la entrada de nitrato a la célula, su reducción hasta amonio y la incorporación de éste a esqueletos carbonados, con la consiguiente formación de aminoácidos.

El paso inicial, el transporte de nitrato a la célula, es el estadio menos conocido del proceso, aunque estudios llevados a cabo con diversos organismos, que se describirán más adelante, han puesto de manifiesto la participación de proteínas y su requerimiento de energía. Una vez que el nitrato se ha transportado al interior celular ha de reducirse hasta amonio. Esta reducción requiere ocho electrones y ocurre en dos pasos secuenciales: la reducción de nitrato a nitrito, que implica la transferencia de dos electrones y está catalizada por la nitrato reductasa, y la reducción de nitrito a amonio, que requiere seis electrones, catalizada por la nitrito reductasa (Guerrero *et al*, 1981, Lara y Guerrero, 1989, Lara, 1992). El amonio resultante de reducción del nitrato o proveniente del medio externo se incorpora a esqueletos carbonados por la ruta glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT) (Mifflin y Lea, 1982), en la que primero el amonio se incorpora a una molécula de glutamato para dar glutamina, en una reacción catalizada por la GS que requiere Mg^{2+} y ATP, y a continuación, el grupo amido de la glutamina se transfiere al α -cetoglutarato, generándose dos moléculas de glutamato en una reacción que requiere dos equivalentes de reducción, catalizada por la GOGAT. Parte del glutamato resultante puede reciclarse en la reacción de la GS,

donando el resto su grupo amino a una gran variedad de α -cetoácidos, dando así lugar a la formación de diferentes aminoácidos (Guerrero y Lara, 1987, Lara y Guerrero, 1989).

Dado que el transporte de nitrato a la célula es el paso menos conocido en el proceso global de asimilación de nitrato, en este trabajo se ha abordado su estudio en la cianobacteria unicelular *Anacystis nidulans*. Las cianobacterias son organismos fotosintéticos modélicos para el estudio de procesos de transporte, por tener una organización estructural y funcional típicamente procariótica. Llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica, similar a la de algas eucarióticas y plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977, Wolk, 1980, Fay, 1983), y utilizan el poder reductor y la energía de enlace fosfato generados fotosintéticamente para la asimilación de compuestos inorgánicos de carbono, nitrógeno y azufre (Losada y Guerrero, 1979, Losada *et al*, 1987).

Asimilación de nitrato en cianobacterias

En las cianobacterias, la actividad nitrato reductasa es dependiente de ferredoxina (Hattori y Myers, 1967, Manzano *et al*, 1976, Ortega *et al*, 1976, Candau, 1979, Flores *et al*, 1983a, Mikami e Ida, 1984, Guerrero y Lara, 1987), a diferencia de la de organismos eucariotas que es dependiente de NAD(P)H (Guerrero *et al*, 1981). Generalmente la nitrato reductasa se encuentra asociada a la membrana tilacoidal, tanto en cianobacterias unicelulares (Manzano *et al*, 1976) como filamentosas (Hattori y Myers, 1967, Ida y Mikami, 1983, Ortega *et al*, 1976). Este enzima se ha purificado

hasta homogeneidad en *Anacystis nidulans* (Candau, 1979, Guerrero *et al*, 1981), *Plectonema borianum* (Mikami e Ida, 1984) y *Phormidium laminosum* (Serra *et al*, 1990), habiéndose caracterizado como una molibdo-ferrosulfo-proteína monomérica de 75-85 kDa.

La actividad nitrito reductasa, como en otros organismos fotosintéticos, es también dependiente de ferredoxina (Hattori y Uesugi, 1968, Manzano *et al*, 1976, Peschek, 1979, Méndez y Vega, 1981, Guerrero *et al*, 1981). En *A. nidulans* se encuentra fuertemente asociada a las membranas tilacoidales (Candau *et al*, 1976, Manzano *et al*, 1976), aunque en las estirpes filamentosas *Anabaena* y *Nostoc* está débilmente unida a membranas (Hattori y Myers, 1966, Hattori y Uesugi, 1968, Ortega *et al*, 1976, Méndez y Vega, 1981, Guerrero *et al*, 1981). La nitrito reductasa, purificada parcialmente de *A. nidulans* (Manzano *et al*, 1976), *Spirulina platensis* (Yabuki *et al* 1985), *Phormidium laminosum* (Serra *et al*, 1990), *Anabaena* 7119 (Méndez y Vega, 1981, Méndez *et al*, 1981) y *Anabaena cylindrica* (Hattori y Uesugi, 1968), es una hierro-proteína monomérica de 52-68 kDa.

La GS de cianobacterias unicelulares y filamentosas está compuesta de doce subunidades idénticas de unos 50 kDa, ordenadas en dos anillos hexagonales superpuestos (Stacey *et al*, 1977, Sampaio *et al*, 1979, Orr *et al*, 1981, Florencio y Ramos, 1985, Serra *et al*, 1985, Sawa *et al*, 1988, Blanco *et al*, 1989, Mérida *et al* 1990). La GOGAT utiliza ferredoxina reducida como donador de electrones, y está formada por un sólo polipéptido de 160 kDa que contiene flavina (Marqués *et al*, 1992).

La naturaleza fotosintética de la asimilación de nitrato en cianobacterias, como en otros organismos (Lara, 1992), se ha puesto de manifiesto midiendo la producción de O₂ dependiente de nitrato en ausencia de CO₂ en células de *A. nidulans* (Flores *et al*, 1983b) y en membranas tilacoidales aisladas (Candau *et al*, 1976, Ortega *et al*, 1976, Losada y Guerrero, 1979). También se ha evidenciado el acoplamiento entre la reducción de nitrato y la fotólisis del agua en condiciones de asimilación simultánea de CO₂ y nitrato, midiendo la producción extra de O₂ dependiente de nitrato. En *A. nidulans*, a concentraciones saturantes de CO₂, la adición de nitrato aumenta la velocidad de desprendimiento de O₂ a cualquier intensidad luminosa, siendo máxima esta estimulación en condiciones de iluminación saturante. Esto indica que cuando el CO₂ es el único aceptor de electrones del aparato fotosintético, la velocidad de transporte no-cíclico de electrones no está limitada por luz, sino por la de fijación de CO₂ a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato. Al añadir un segundo aceptor de electrones, el nitrato, se libera al aparato fotosintético de esta limitación, acelerándose el flujo no-cíclico de electrones desde el agua a la ferredoxina. El nitrato, por tanto, estimula la capacidad máxima del aparato fotosintético en *Anacystis* (Romero y Lara, 1987) sin modificar el rendimiento cuántico (Romero *et al*, 1989a).

La entrada de nitrato se ha estudiado convencionalmente midiendo el consumo de nitrato del medio (Flores *et al*, 1983a, Guerrero y Lara, 1987, Syrett, 1988). Diversos estudios mostraron que el consumo de nitrato presenta una cinética de saturación con K_m para el nitrato inferior a 50 µM, esto es, con una afinidad por

nitrate mucho mayor que la de la nitrate reductase (Zevenboom *et al*, 1980, Meeks *et al*, 1983, Flores *et al*, 1983b, Tischner y Schmidt, 1984). Esta aproximación experimental no permite, sin embargo, el estudio del transporte propiamente dicho, independientemente de la asimilación posterior del nitrate.

Con objeto de separar el proceso de transporte, se ha desarrollado un método muy sensible para la determinación de la acumulación intracelular de nitrate en *A. nidulans*. Puesto que la concentración intracelular de nitrate está determinada por el balance entre la velocidad neta de transporte del ión y su velocidad de reducción, la determinación intracelular de nitrate constituye una medida directa de la actividad de transporte de nitrate cuando la reducción no sea operativa. El método consiste en el análisis de nitrate por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) de intercambio aniónico, seguida de detección espectrofotométrica a 210 nm, en lisados celulares en ácido obtenidos por centrifugación de las células a través de aceite de silicona, una técnica que permite la separación rápida de las células del medio de ensayo y su lisis inmediata (Lara *et al*, 1987, Romero *et al*, 1989b). Así, en células de *A. nidulans* tratadas con wolframio (que sintetizan una nitrate reductase inactiva (Herrero y Guerrero, 1986)), se ha medido, en condiciones de iluminación, una acumulación intracelular de nitrate en contra de su gradiente electroquímico, indicativa de un transporte activo de nitrate (Lara *et al*, 1987). En oscuridad, donde apenas hay reducción de nitrate por falta de ferredoxina reducida, se han obtenido resultados similares (Sivak *et al*, 1989, Guerrero *et al*, 1990).

En este trabajo se ha seleccionado un sistema experimental en el que se obvian los efectos laterales del tratamiento con wolframio y las limitaciones de poder reductor y energía que se producen en oscuridad. Se presenta la caracterización del transporte de nitrato en un mutante de *A. nidulans* R2 carente de actividad nitrato reductasa, la estirpe FM6 (Madueño *et al*, 1988a). El transporte de nitrato en esta estirpe es fuertemente endergónico y en base a su requerimiento por sodio, a la inhibición aparente por nitrato y al análisis cinético realizado, se propone un mecanismo de simporte $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$ para el transporte de nitrato.

En trabajos llevados a cabo con otros organismos, y en base a resultados de estudios cinéticos, medidas de flujos iónicos, cambios en el potencial de membrana, dependencia por pH, cationes y energía, se han propuesto diferentes modelos de transporte de nitrato, que incluyen:

- simporte electrogénico H^+/NO_3^- con estequiometría de 2H^+ por NO_3^- , fundamentado principalmente en la despolarización de la membrana y el consumo de H^+ observados tras la adición de nitrato. Este sistema se ha propuesto para la levadura *Candida albicans* (Eddy y Hopkins, 1985), el alga acidófila *Cyanidium caldarium* (Fuggi, 1985, 1990), raíces de maíz y *Limnobium* (McClure *et al*, 1990a,b, Ullrich y Novacky, 1990), *Lemna gibba* (Ullrich y Novacky, 1981, Ullrich, 1992) y *Arabidopsis thaliana* (Tsay *et al*, 1993).

- antiporte electrogénico $\text{OH}^-/\text{NO}_3^-$ en raíces de maíz (Thibaud y Grignon, 1981) y células de *Catharanthus roseus* (Rona *et al*, 1990), experimentalmente indistinguible del anterior (Ullrich, 1992).



no se ve afectada a corto plazo por el amonio se propuso que la entrada de nitrato al interior celular sería el punto de control (Ohmori *et al*, 1977, Flores *et al*, 1980, 1983a, Guerrero y Lara, 1987). Efectivamente, se ha verificado que el transporte de nitrato en células de *A. nidulans* tratadas con wolframio se inhibe al añadir amonio al medio y que la inhibición no se manifiesta si se bloquea la asimilación de amonio con MSX (Lara *et al*, 1987). Estos datos indican que la actividad de transporte de nitrato en *Anacystis* está sometida a regulación "feed-back" por compuestos nitrogenados, y proporcionan evidencia de que la asimilación de nitrato se controla en primera instancia a nivel del suministro de sustrato a la célula.

Un efecto a más largo plazo del amonio se manifiesta en la represión de los enzimas implicados en la asimilación de nitrato. Mientras que células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato presentan altos niveles de actividad nitrato reductasa (Herrero *et al*, 1981) y nitrito reductasa (Herrero y Guerrero, 1986), las cultivadas con amonio presentan niveles insignificantes de dichas actividades. En base a estudios con inhibidores de la síntesis de ARNm y de proteínas, se ha propuesto que el control por amonio se ejerce a nivel de la transcripción (Herrero *et al*, 1981, Herrero y Guerrero, 1986). Efectivamente, se ha comprobado que los genes implicados en la asimilación de nitrato se cotranscriben juntos en un operón y que el amonio reprime su transcripción (Suzuki *et al*, 1992, Luque *et al*, 1992, Omata *et al*, 1993). El efecto a largo plazo del amonio depende también de su asimilación, ya que el tratamiento con MSX permite la síntesis de nitrato y nitrito reductasa en presencia de amonio

(Herrero *et al*, 1981, 1985, Ramos *et al*, 1982, Flores *et al*, 1983a, Ramos y Guerrero, 1983, Herrero y Guerrero, 1986).

En este trabajo se ha estudiado la regulación por la fuente de nitrógeno del transporte de nitrato, observándose que su control a medio-largo plazo es semejante al de los enzimas implicados en la asimilación de nitrato. Por otra parte, se ha establecido una correlación entre el transporte de nitrato y un polipéptido de 47 kDa presente en la membrana plasmática de células de *A. nidulans*, que está sometido al mismo tipo de regulación nitrogenada. También en la membrana plasmática de *A. nidulans* R2 existe un polipéptido de 45-48 kDa cuando las células se cultivan con nitrato, que no aparece en células cultivadas con amonio (Madueño, 1988b, Omata *et al*, 1989). Omata y col. (1989) han construido un mutante, la estirpe M45, que carece de la proteína de 45 kDa independientemente de la fuente de nitrógeno con que se cultive. Puesto a nuestra disposición este mutante, se ha ensayado su actividad de transporte de nitrato, observándose que la carencia de dicha proteína se correlaciona con la incapacidad de transportar nitrato. El polipéptido de 45-47 kDa aparece, pues, como un elemento esencial para el transporte de nitrato.

Los efectos negativos a corto y largo plazo del amonio sobre la asimilación de nitrato implican la existencia de señales reguladoras cuya naturaleza es aún desconocida. Dado que se requiere la asimilación de amonio para que se produzcan dichos efectos, los niveles de aminoácidos y concretamente de glutamina, podrían estar implicados en los respectivos mecanismos de control. En *A. nidulans* se ha observado, sin embargo, que no existe correlación entre los

niveles intracelulares de glutamina ni de otros aminoácidos y el grado de expresión del sistema de asimilación de nitrato (Coronil y Lara, 1991) o la actividad de consumo de nitrato (Coronil, 1992) por lo que se excluye la implicación directa de estos compuestos en la regulación de la síntesis y de la actividad del sistema de transporte de nitrato.

En este trabajo se ha realizado estudios de fosforilación "in vitro" de polipéptidos de membranas plasmáticas de *Anacystis nidulans*, habiéndose puesto de manifiesto la existencia de una actividad proteína kinasa en la membrana, sensible a amonio, que podría tener relación con el efecto a corto plazo del amonio sobre la actividad de transporte de nitrato.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo se han presentado a diferentes congresos nacionales e internacionales y han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- 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.* 158:257-262.

-Guerrero, M.G., Romero, J.M., Rodríguez, R. y Lara, C. (1990). Nitrate transport in cyanobacteria. En "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds) pp 79-85, Springer, Berlin.

- Rodríguez, R., Lara, C. y Guerrero, M.G. (1992). Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem. J.* 282:639-643.

-Lara, C., Rodríguez, R. y Guerrero, M.G. (1993) Sodium-dependent nitrate transport and energetics of cyanobacteria. *J. Phycol.* 29:389-395.

- Lara, C., Rodríguez, R. y Guerrero, M.G. (1993). Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.* 87:528-534.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Estirpes empleadas

Los organismos utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla I. Todos son cianobacterias unicelulares no fijadoras de dinitrógeno, pertenecientes al género *Synechococcus* (sección I de la clasificación propuesta por Rippka *et al*, 1979), también denominado *Anacystis* (Kratz y Myers, 1955).

La estirpe mutante FM6, obtenida a partir de *Anacystis nidulans* R2 por mutagénesis con el transposón Tn 901, carece de actividad nitrato reductasa, y por tanto no puede crecer en nitrato, pero sí en nitrito o amonio (Madueño *et al*, 1988a).

La estirpe mutante M45 también ha sido obtenida a partir de *A. nidulans* R2, mediante la inactivación específica, por inclusión de un cassette de resistencia a kanamicina, de un gen que codifica una proteína de 45 kDa de la membrana plasmática. Su principal característica es que requiere altas concentraciones de nitrato (80 mM) para crecer, aunque puede hacerlo en amonio a las concentraciones normales (15 mM), y presenta niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa similares a los de la estirpe silvestre (Omata *et al*, 1989).

Tabla I

Estirpes utilizadas y particularidades de las condiciones de crecimiento

Estirpe ^a	Fenotipo	Particularidades de las condiciones de crecimiento ^b	
		Fuente nitrógeno	t ^a (°C)
<i>Synechococcus</i> sp PCC 6301 (<i>Anacystis nidulans</i> 1402, Universidad de Göttingen)	silvestre	KNO ₃ , 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 7,5 mM	40
<i>Synechococcus</i> sp PCC 7942 (<i>Anacystis nidulans</i> R2)	silvestre	KNO ₃ , 20 mM	40
<i>Synechococcus</i> sp PCC 7942 FM6 ^c	mutante	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 7,5 mM KNO ₂ , 4 mM	40
<i>Synechococcus</i> sp PCC 7942 M45 ^d	mutante	KNO ₃ , 80 mM	30

^a PCC colección de cultivos del Instituto Pasteur (Francia).

^b se indican las particularidades de las condiciones habituales de crecimiento de cada estirpe. Otras condiciones utilizadas se indicarán en los experimentos en cuestión.

^{c,d} estirpes mutantes derivadas de *A. nidulans* R2.

2.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las estirpes se cultivaron fotoautotróficamente en condiciones axénicas, en un medio líquido sintético (Herrero *et al*, 1981), con la siguiente composición:

K ₂ HPO ₄	12 mM
NaHCO ₃	10 mM
NaCl	2 mM
MgSO ₄	0,5 mM
CaCl ₂	0,1 mM
H ₃ BO ₃	46 μM
MnCl ₂	9 μM
Na ₂ MoO ₄	4 μM
ZnSO ₄	0,77 μM
CuSO ₄	0,32 μM

Nitrógeno combinado, según la estirpe (Tabla I)

Solución Fe-EDTA 1 ml/l

La solución de Fe-EDTA se preparaba disolviendo 16 g de EDTA (ácido libre) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua destilada que a su vez se mezclaba con una disolución que contenía 13,7 g de FeSO₄-7H₂O en 364 ml de agua destilada (Arnon *et al*, 1974). A través de la mezcla se burbujeaba aire durante varias horas (6-12 h) a fin de oxidar totalmente el hierro.

El medio de cultivo (35 ml) conteniendo todos los componentes excepto fosfato, bicarbonato y la fuente de nitrógeno se colocaba en

tubos de cristal (20 cm de largo por 2,3 cm de diámetro) que se cerraban con un tapón de algodón graso atravesado por una varilla de vidrio, a cuyo extremo superior se conectaba un tubo de goma parcialmente relleno de algodón graso y cerrado con pinzas. Los medios así preparados, se esterilizaban en un autoclave Selecta modelo P durante 20 min a 1 atm de sobrepresión (121°C). Las disoluciones concentradas (2 ml) de sales de nitrógeno, por un lado, y las de fosfato y bicarbonato, por otro, se esterilizaban por separado en las mismas condiciones y, una vez enfriadas, se añadían al medio de cultivo inmediatamente antes de inocular, para evitar la precipitación de las sales de fosfato.

Los tubos con el medio de cultivo se inoculaban en una campana de flujo laminar con una cantidad de células equivalente a 10-15 μg clorofila *a*. La suspensión celular se incubaba en un baño termostatzado a 40 o 30 °C, dependiendo de la estirpe (Tabla I), con iluminación continua proporcionada por tubos fluorescentes (160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y se burbujeaba con una mezcla gaseosa estéril de aire : CO₂ (95:5 v/v), que proporcionaba al cultivo agitación y fuente continua de carbono.

Dado que la estirpe FM6 se crecía rutinariamente en amonio como fuente de nitrógeno, para los ensayos de transporte de nitrato era necesario inducir el sistema de asimilación de nitrato en ausencia de amonio (Sivak *et al*, 1989). Para ello, una cantidad de células equivalente a 150 μg de clorofila *a* se recogía por centrifugación (2500 g, 15 min , t^a ambiente), se transfería a medio de cultivo con KNO₂ 4 mM como fuente de nitrógeno y se incubaba en condiciones de crecimiento durante 18 h.

El mutante M45 se cultivaba en presencia de kanamicina (5 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar su resistencia a este antibiótico. La adición de kanamicina al medio de cultivo se realizaba tras la esterilización de una solución concentrada del antibiótico por filtración a través de filtros Millex GS (Millipore) de 0,22 μm de tamaño de poro.

En los estudios de inducción de la actividad de transporte de nitrato y de la síntesis de polipéptidos de membrana plasmática implicados en dicho transporte, era necesario transferir las células a medios con distintas fuentes de nitrógeno. Para ello, células de *A. nidulans* cultivadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,5 mM, hasta una densidad celular de 15-20 μg clorofila *a*/ml, se recogían por centrifugación (8000 g, 10 min, t^a ambiente) y, tras lavarlas varias veces con medio de cultivo sin fuente de nitrógeno, se resuspendían en medios con diferentes fuentes de nitrógeno (a una concentración final en nitrógeno de 5 mM) y se mantenían en condiciones de crecimiento durante el tiempo requerido para cada experimento en particular, como se indicará en cada caso a pie de figura.

2.1.3. Recogida de células

Para los experimentos descritos en esta tesis, se utilizaron células de cultivos líquidos en fase exponencial tardía conteniendo una cantidad de células equivalente a 20-25 μg clorofila *a*/ml de medio. Las células se recogían por centrifugación a temperatura ambiente, bien en una centrífuga de mesa Heraeus modelo Labofuge 1 a baja velocidad (2500 g, 15 min) o en centrífuga Sorvall modelo

RC2-B y RC5-C (10000 g, 10 min), según fuese el volumen del cultivo.

En todos los ensayos biológicos, las células se lavaban varias veces con tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3 excepto en las determinaciones de la actividad de transporte de nitrato en que se ensayaba el requerimiento por cationes monovalentes, que se hacía con tampón Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3.

En todos los casos, las células se resuspendían en un pequeño volumen del mismo tampón de lavado y se determinaba la cantidad de clorofila *a* existente.

2.1.4. Conservación de las cepas cianobacterianas

Las estirpes se mantuvieron en cultivos en medio sólido en cajas de Petri. Se utilizó el medio BG110 (Rippka *et al*, 1979) suplementado con distintas fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , 17,6 mM, para *A. nidulans* y *A. nidulans* R2; NaNO_3 , 80 mM, para la estirpe M45 ó NH_4Cl , 4 mM, para la estirpe FM6) y solidificado con agar al 1%. El agar se autoclavaba por separado del resto del medio de cultivo y se añadía inmediatamente antes de extender las placas de Petri. Cuando se usaba amonio como fuente de nitrógeno el medio se tamponaba con TES-NaOH, 8 mM, pH 7,5. Cuando la fuente de nitrógeno utilizada era nitrato el medio se suplementaba con NaHCO_3 12 mM. Al igual que en el cultivo en medio líquido, la estirpe M45 se mantenía en medio sólido con kanamicina (5 $\mu\text{g/ml}$).

Las cajas de Petri inoculadas con la cianobacterias se mantenían en una cámara de cultivo a 30 °C iluminadas con luz blanca continua procedente de tubos fluorescentes.

2.1.5. Tests de contaminación de las estirpes cianobacterianas

Para determinar si los cultivos líquidos o sólidos de cianobacterias se encontraban en condiciones axénicas, alícuotas de dichos cultivos se sembraban en cajas de Petri con medio Luria, que contenía por litro de agua, 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura y se solidificaba con agar al 1,5%. En este medio rico, las cianobacterias no crecían, permitiendo determinar la existencia de algún contaminante en el cultivo. Por otra parte, los cultivos líquidos también se examinaban al microscopio óptico.

2.2. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS

Las preparaciones de membrana plasmática se obtuvieron según la técnica descrita por Omata y Ogawa (1986) con pequeñas modificaciones.

Una cantidad de células, equivalente a 2 mg de clorofila *a*, cultivadas en medio líquido como se describe en la sección 2.1.2, se recogieron por centrifugación (8000 g, 10 min, 20 °C), se lavaron con tampón TES-NaOH, 5 mM, pH 7, que contenía sacarosa 0,6 M y EDTA 0,5 mM, y, tras centrifugar en las mismas condiciones, se resuspendieron en 20 ml del mismo tampón. A esta suspensión celular se añadió 6 mg de lisozima y se incubó con agitación continua durante 2 h a 30 °C en oscuridad con objeto de debilitar sus paredes celulares. Transcurrido dicho tiempo, las células se recogieron por centrifugación (8000 g, 5 min, 4 °C), se lavaron con tampón TES-NaOH, 20 mM, pH 7, que contenía sacarosa 0,6 M, y, tras una nueva centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de dicho tampón. A partir de este momento, todas las operaciones se realizaron a 4 °C. A esta suspensión celular se añadió desoxirribonucleasa I (0,0001%), para facilitar la degradación del ADN, y una mezcla de inhibidores de proteasas (fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), 1mM; ácido ϵ -aminocaproico, 1mM; y benzamidina, 1 mM) para impedir la degradación de las proteínas. Las células se rompieron en una prensa de French marca Aminco, provista de una célula de rotura FA-073 a 80 mPa y 4 °C. El homogenado resultante se centrifugó (8000 g, 10 min, 4°C) para eliminar las células que no se habían roto.

El sobrenadante, que contenía sacarosa al 20,5%, se llevó al 50% (p/v) añadiendo 0,74 volúmenes de sacarosa al 90%, como paso previo al fraccionamiento por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Para ello, se prepararon tubos de centrifuga de polialómero de 35 ml de volumen total colocando en primer lugar 17 ml del extracto celular conteniendo sacarosa al 50%, y a continuación varias capas de disoluciones de sacarosa de concentraciones decrecientes (Esquema 1), que contenían en todos los casos TES-NaOH, 10 mM, pH 7; NaCl, 100 mM y EDTA, 5 mM.

Los gradientes se sometieron a ultracentrifugación (130.000 g, 18 h, 4 °C) en una ultracentrifuga Beckman modelo L8-80M con rotor basculante (Beckman SW 28). Los componentes celulares se distribuyeron, según su densidad, entre las distintas capas del gradiente. Como muestra la Figura 1, la fracción de membrana plasmática, de color anaranjado, se localizó en la capa correspondiente al 30% sacarosa, las membranas tilacoidales (de color verde) se situaron en la interfase entre 39-50% de sacarosa, la fracción soluble conteniendo ficocianinas y ficoeritrinas de color púrpura fluorescente permaneció en la zona de sacarosa al 50% y en el fondo del tubo sedimentaron paredes y restos celulares pesados.

La banda de membranas plasmáticas se extrajo del tubo con una jeringuilla y tras diluirla 3 veces con tampón TES-NaOH, 10 mM, pH 7, conteniendo NaCl, 10 mM, se ultracentrifugó de nuevo (150.000 g, 2 h, 4 °C en un rotor de ángulo fijo Beckman 60 Ti) para

Esquema 1

Preparación del gradiente discontinuo de sacarosa en tubos de polialómero para la purificación de membranas plasmáticas de *A. nidulans*

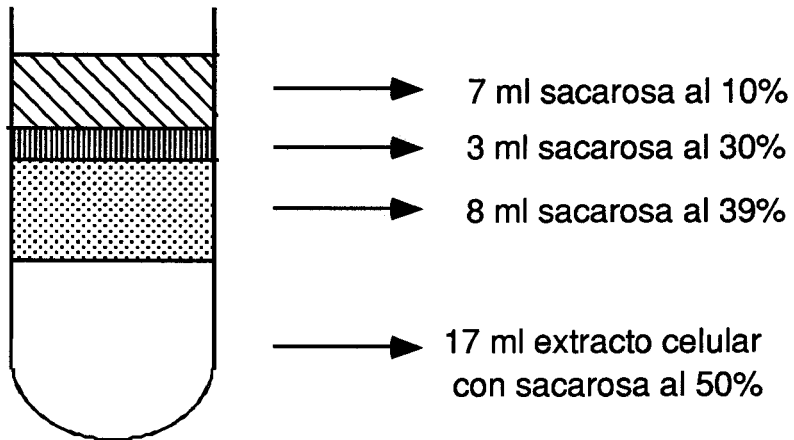
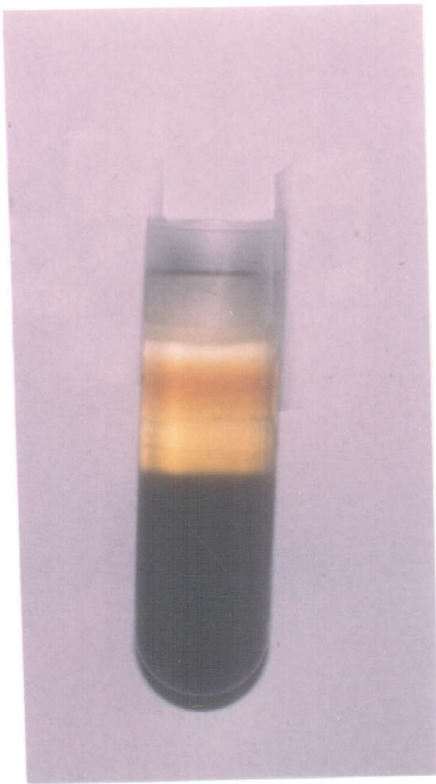


Figura 1

Distribución de las diferentes fracciones celulares, en función de sus densidades, a lo largo del gradiente de sacarosa.



← Membranas plasmáticas

← Membranas tilacoidales

← Fracción soluble

recoger y concentrar las membranas. El precipitado resultante se resuspendió en 100 μ l del mismo tampón.

Cuando se prepararon membranas plasmáticas de células sometidas a "shock" de amonio, se añadió NH_4Cl 5 mM a los cultivos 5 min antes de iniciar el proceso preparativo, y se mantuvo presente esta concentración de amonio en los medios de lavado, incubación con lisozima y rotura de las células.

Cuando se necesitaba fracción soluble, se extraía del tubo de gradiente la fracción correspondiente con una jeringuilla y, se diluía y centrifugaba, siguiendo el mismo procedimiento descrito para las membranas plasmáticas, con objeto de eliminar restos de membranas tilacoidales contaminantes. Tras la ultracentrifugación, se recogía el sobrenadante, de color azul pálido, que se utilizaba directamente como fracción soluble celular.

2.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS EN CELULAS INTACTAS

2.3.1. Ensayo de transporte de nitrato

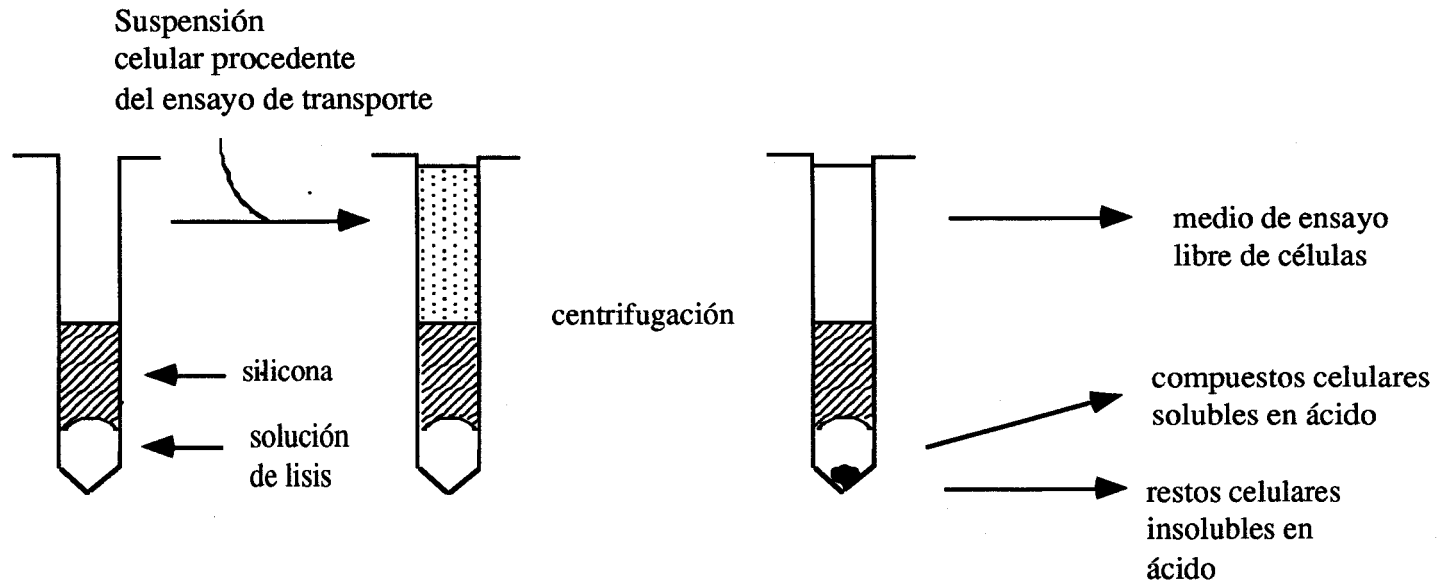
La actividad de transporte de nitrato se determinó midiendo la acumulación intracelular de nitrato en lisados celulares ácidos obtenidos por centrifugación rápida de las células a través de una capa de aceite de silicona (Romero *et al*, 1989b).

Para ello, se preparaban tubos de polietileno de 0,4 ml que contenían, en el fondo, 20 μ l de una mezcla de ácido amidosulfúrico 20 mM y H_3PO_4 2M y, encima, una capa de aceite de silicona compuesta por una mezcla 2:1 (v/v) de silicona Versilube F-50 (Serva) y silicona 14615-3 (Aldrich), sobre la que, en su momento, se colocaría la suspensión celular (Esquema 2). Esta técnica se basa en que, al centrifugar rápidamente manteniendo el tubo en posición horizontal, la capa de silicona filtra las células hasta la solución de lisis. En dicha solución se liberan los compuestos celulares solubles en ácido, entre los que se encuentra el nitrato, mientras que las paredes, membranas, proteínas y otros compuestos insolubles en ácido precipitan en el fondo del tubo (Heldt, 1980).

Los ensayos de transporte de nitrato se llevaron a cabo a 40 °C en matraces erlenmeyers de 10 ml con agitación continua en condiciones de iluminación ($140 \mu E m^{-2} s^{-1}$) o en oscuridad. Para los ensayos standards el medio (5 ml) contenía: Tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3 (a 40 °C); $NaHCO_3$, 10 mM; una cantidad de células equivalente a 33 μ g clorofila *a*/ml, y una concentración

Esquema 2

Procedimiento de centrifugación de las células a través de silicona



variable de NaNO_3 . Para los ensayos de dependencia por cationes monovalentes, el medio contenía Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3 (40 °C); HNO_3 , en concentraciones variables; concentraciones también variables del catión monovalente a ensayar, añadido en forma de cloruro, y una cantidad de células equivalente a 33 μg clorofila *a*/ml.

Los ensayos se iniciaban simultáneamente por la adición de nitrato e iluminación ó sólo adición de nitrato en los ensayos en oscuridad. En ambos casos, antes de ensayar, las células se preincubaban 2 min en oscuridad para que se estabilizara la temperatura. A intervalos regulares (tiempo total de 6 min), se tomaban alícuotas de 0,3 ml y se transferían rápidamente a los tubos de polietileno preparados previamente con la solución de lisis y la silicona. Estos tubos se sometían a una centrifugación rápida (10000 *g*, 1 min) en una Microfuge 11 (Beckman) con rotor horizontal. Los lisados ácidos celulares se recogían para analizar el nitrato por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) de intercambio aniónico con detección espectrofotométrica (sección 2.5.1.1).

La concentración intracelular de nitrato en células de *A. nidulans* se ha calculado para un volumen acuoso interno de 100 μl /mg clorofila *a* (Miller y Calvin, 1985).

Todos los ensayos de transporte de nitrato se realizaron al menos 5 veces y el análisis de nitrato intracelular de cada alícuota del ensayo se hizo por duplicado, utilizándose las medias aritméticas de los duplicados. En las figuras se muestra un experimento representativo de cada ensayo.

2.3.2. Ensayo de consumo de nitrato

El consumo de nitrato se estimó siguiendo la desaparición de nitrato del medio de ensayo. Los ensayos se realizaban en matraces erlenmeyers de 10 ml abiertos al aire, en un baño termostatzado a 40 °C, con agitación e iluminación ($140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continuas durante 20-30 min. El medio de ensayo (10 ml) contenía: Tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, (a 40 °C), KNO_3 , 0,25 mM, NaHCO_3 , 10 mM y una cantidad de células equivalente a 10 μg clorofila *a*/ml. La determinación se iniciaba iluminando y añadiendo simultáneamente KNO_3 y NaHCO_3 . A intervalos de tiempo regulares se tomaban alícuotas de 0,5 ml y se centrifugaban en una Microfuge 11 (Beckman) a 10000 g durante 3 min para sedimentar las células. El nitrato presente en el sobrenadante del medio de ensayo se analizaba espectrofotométricamente (sección 2.5.1.2).

2.3.3. Determinación del desprendimiento de O_2 dependiente de CO_2

El desprendimiento de O_2 dependiente de CO_2 se determinó por técnicas polarográficas utilizando un electrodo de O_2 Hansatech DW. La calibración del electrodo se realizaba cuantificando la respuesta eléctrica respecto a la diferencia de concentración de O_2 del agua destilada y de una disolución de ditionito sódico (Walker, 1988). Los ensayos se llevaron a cabo a 40 °C, con agitación e iluminación ($140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) continuas. El medio de ensayo (3 ml) contenía: Tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3 (a 40 °C), NaHCO_3 , 10 mM, y una

cantidad de células equivalente a 10 µg clorofila *a*/ml (Romero y Lara, 1987). Las células se preincubaban en oscuridad unos minutos para que se estabilizara la temperatura, y el ensayo se iniciaba en iluminación al añadir el NaHCO₃, realizando un registro continuo de la producción de O₂ hasta que la pendiente de la recta obtenida fuese constante.

2.3.4. Tratamiento con inhibidores

Para ensayar el efecto de posibles inhibidores del transporte de nitrato, las células se preincubaban en oscuridad a 40 °C, en presencia o ausencia del inhibidor durante un periodo de tiempo determinado, antes de iniciar el ensayo de transporte, manteniéndose el inhibidor durante el ensayo.

Como excepción a esta norma general, en los casos del nitrito y clorato, no existía incubación previa, añadiéndose al medio de ensayo inmediatamente antes de iniciarlo.

En el caso de la monensina, un ionóforo que relaja el gradiente electroquímico de sodio (Skulachev, 1985; Brown *et al*, 1990), las células se preincubaban durante 5 min con el ionóforo antes de iniciar el ensayo. La monensina se disolvía en etanol, por lo que los controles correspondientes se hicieron con la misma concentración de etanol.

Cuando se utilizó amiloride, un inhibidor del antiporte Na⁺/H⁺ y de canales de sodio (Kleyman y Cragoe, 1990; Kaplan *et al*, 1989), la preincubación se realizó durante 15 min antes del inicio del ensayo.

El tratamiento con *orto*-nitrobenzaldehido (ONB), un compuesto cuyo grupo nitro es análogo estructural del nitrato (Tischner y Lorenzen, 1981), se llevó a cabo preincubando las células en el medio de ensayo con el inhibidor durante 10 min.

El fenilglioxal (PGO), un compuesto que se une covalentemente a restos de arginina de las proteínas (Glazer, 1976, Dhugga *et al*, 1988), se preincubó con las células durante 30 min.

Tanto el ONB como el PGO se utilizaron en otros ensayos biológicos (consumo de nitrato y desprendimiento de O₂ dependiente de CO₂ respectivamente) con la misma preincubación que para los ensayos de transporte de nitrato. Cuando se pretendía ver la reversibilidad del efecto inhibidor, tras la preincubación se lavaban las células y se resuspendían de nuevo en medio de ensayo sin inhibidor.

El tratamiento con L-metionina D,L-sulfoximina (MSX) un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa y, por tanto, de la asimilación de amonio (Tate y Meister, 1973), se realizó preincubando las células con este compuesto durante 15 min antes de iniciar el ensayo.

2.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS EN FRACCIONES CELULARES

2.4.1. Fosforilación de polipéptidos de membrana plasmática con ^{32}P -ATP

La fosforilación de polipéptidos de la membrana plasmática se ensayó "in vitro" como la incorporación de marcaje procedente de γ - ^{32}P -ATP.

La mezcla de reacción (30 μl) para los ensayos standards contenía: TES-NaOH, 23 mM, pH 7, MgCl_2 , 5 mM, membranas plasmáticas equivalentes a 60 μg de proteína y γ - ^{32}P -ATP, 0,11 μM , (110 TBq/mmol). La reacción se inició añadiendo el ^{32}P -ATP y se mantuvo durante 30 min a 30 °C. Transcurrido dicho tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 10 μl del tampón de electroforesis (concentrado 4 veces: Tris-HCl, 125 mM, pH 6,8, SDS, 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,01%) y calentando 5 min a 100 °C para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras así tratadas se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gradientes lineales del 7,5-15% (sección 2.5.2.1). El perfil de polipéptidos se reveló mediante tinción con azul de Coomassie (sección 2.5.2.2) y las proteínas marcadas se visualizaron por autorradiografía siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.5.2.4.

2.4.2. Determinación de actividad fosfatasa en la fracción soluble celular

La actividad fosfatasa alcalina se ensayó en la fracción soluble de *A. nidulans*, preparada como se describe en la sección 2.2, con *p*-nitrofenil-fosfato como sustrato (Walter y Schütt, 1974). Los ensayos se realizaron a 30 °C, en una mezcla de reacción que contenía: Tampón Tris-HCl, 25 mM, pH 8; KCl, 20 mM; CaCl₂, 30 mM y fracción soluble equivalente a 60 µg proteína/ml. La reacción se iniciaba con la adición de 30 mM de *p*-nitrofenil-fosfato, y tras 1 h de incubación se determinaba el *p*-nitrofenol producido, midiendo la absorbancia a 420 nm ($E=12,075 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.5. METODOS ANALITICOS

2.5.1. Análisis cuantitativo de nitrato

2.5.1.1. Determinación de nitrato por CLAE de intercambio aniónico con detección espectrofotométrica

El análisis del nitrato intracelular de lisados celulares ácidos de *Anacystis* obtenidos por centrifugación de las células a través de sílica (sección 2.3.1) se realizó por CLAE de intercambio aniónico, según el método descrito por Romero *et al* (1989b).

Se ha utilizado un equipo de CLAE Waters compuesto por un inyector automático WISP 710 B; bomba 6000 A; un sistema controlador 720; un espectrofotómetro LC Lambda Max 481 de longitud de onda variable operando a 210 nm y un integrador M 730. En el último año de tesis el controlador y el integrador se sustituyeron por un ordenador PC compatible con el programa Máxima 820 que permitía el control del resto del equipo y el procesamiento de los datos.

La separación cromatográfica de aniones se llevó a cabo de forma isocrática empleando una columna analítica de intercambio aniónico Whatman Partisil-10 SAX (10 μm tamaño de partícula) de 25 cm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno. Entre la bomba y el inyector se dispuso una precolumna de las mismas dimensiones que la columna, rellena de material para precolumna Whatman, para saturar la fase móvil con fase estacionaria con objeto de evitar la

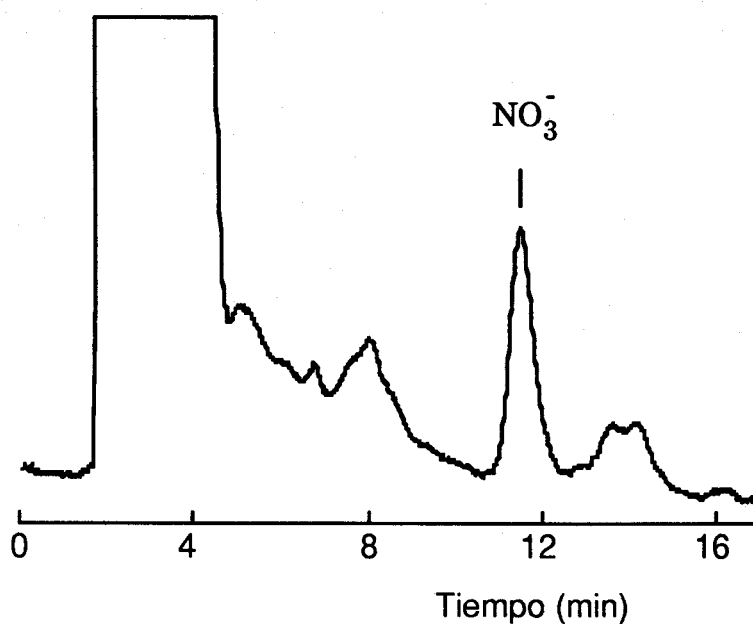
pérdida de resolución de la columna analítica (Atwood *et al*, 1979). Tanto la columna como la precolumna se encontraban en una pequeña cámara termostaticada a 25 °C. La fase móvil, H₃PO₄, 50 mM, conteniendo tetrahidrofurano al 2%, y ajustada a pH 1,9 con una solución concentrada de NaOH, se bombeaba a través de la columna a un flujo constante de 1 ml/min creando una presión de aproximadamente 1000 psi. Las muestras se inyectaron automáticamente con volúmenes de inyección de 10 µl. Los aniones se detectaron espectrofotométricamente en el eluido de la columna por absorción a 210 nm en célula de flujo continuo. Como muestra la Figura 2, en estas condiciones de trabajo, el nitrato se separaba perfectamente del resto de los compuestos aniónicos presentes en los extractos celulares.

Todos los solventes se preparaban con agua obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore), se filtraban a través de filtros Millipore HA (0,45 µm de tamaño de poro) y se desgasificaban en un baño ultrasónico durante 20 min antes de ser utilizados en el proceso cromatográfico.

El nitrato se cuantificó, previa calibración del sistema con soluciones patrones, atendiendo al área de los picos detectados. La respuesta del sistema era lineal (Figura 3), al menos desde 0,1 a 10 nmoles en el volumen de inyección, obteniéndose un coeficiente de correlación de 1,0 entre la cantidad de nitrato y el área del pico correspondiente.

Figura 2

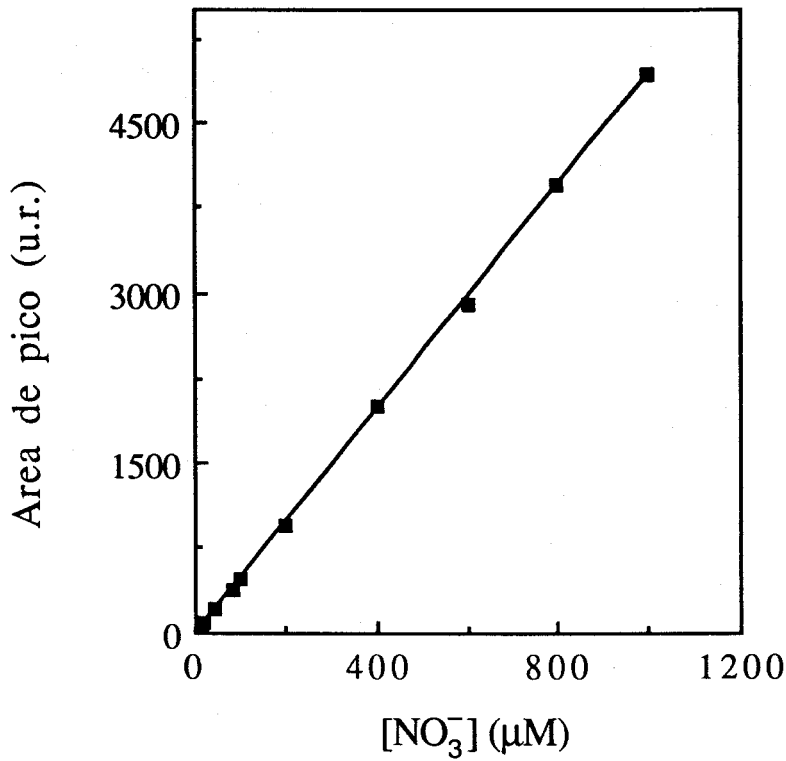
Cromatograma de CLAE de intercambio aniónico de un extracto ácido de células de *A. nidulans* centrifugadas a través de sílica



Las células se lisaron tras centrifugación a través de sílica en una solución de ácido fosfórico 2M conteniendo 20 mM de ácido amidosulfúrico, en las condiciones descritas en la sección 2.3.1. El análisis se realizó con 10 μl del extracto celular. El trazo representa la absorción a 210 nm y se indica el pico correspondiente a nitrato.

Figura 3

Recta de calibrado para la determinación de nitrato por CLAE de intercambio aniónico.



Se prepararon soluciones de nitrato con distintas concentraciones, en H_3PO_4 2M conteniendo ácido amidosulfúrico 20 mM, y se analizaron 10 μl de cada una de ellas en las condiciones descritas en el texto.

2.5.1.2. *Determinación espectrofotométrica de nitrato*

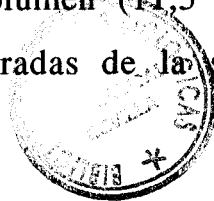
El contenido en nitrato de los sobrenadantes del medio de ensayo del consumo de nitrato (sección 2.3.2), se estimó por el método de Cawse (1967), midiendo directamente la absorbancia a 210 nm en medio ácido. A 0,2 ml de muestra se añadía 0,05 ml de ácido amidosulfúrico al 10% (p/v) para eliminar cualquier traza de nitrito presente. Tras incubar durante 2 min y agitar vigorosamente, se añadía 0,2 ml de ácido perclórico al 20% y se completaba con agua hasta 1 ml. La concentración de nitrato se determinaba midiendo la absorbancia a 210 nm de la disolución en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz aplicando un coeficiente de extinción milimolar de 7,4.

2.5.2. **Análisis electroforético de las preparaciones de membranas plasmáticas en condiciones desnaturalizantes**

2.5.2.1. *Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida*

Las separaciones analíticas de los polipéptidos de la membrana plasmática se realizaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida en gradientes lineales del 7,5-15% de acrilamida o a concentración fija de acrilamida (10%) según el sistema descrito por Laemmli (1970), utilizando una cubeta Protean II TM de BIO-RAD.

Los geles con gradientes lineales del 7,5-15% de acrilamida se prepararon utilizando dos soluciones de igual volumen (11,5 ml) una con acrilamida al 7,5% y la otra al 15% preparadas de la siguiente



forma: para la del 7,5% de acrilamida, se mezclaron 2,875 ml de una solución de acrilamida al 30% y N'N'-Bis-metilen-acrilamida al 0,8%, 2,875 ml de tampón Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8, que contenía SDS al 0,4% y 5,694 ml de agua destilada. La de acrilamida al 15% se preparó de la misma forma que la del 7,5%, añadiendo 5,75 ml de la disolución de acrilamida/bisacrilamida descrita anteriormente, con la salvedad de que llevaba además glicerol al 18% para facilitar la formación del gradiente. Una vez preparadas ambas disoluciones, se eliminaron los gases disueltos en las mezclas mediante vacío en matraces kitasato y se colocaron en un formador de gradiente conectado con una bomba peristáltica al aparato de gelificación, constituido por dos placas de vidrio de 20 x 20 cm y 20 x 22 cm respectivamente, dispuestas paralelamente dejando un espacio de 0,75 mm entre ellas, montadas según las instrucciones del fabricante.

La polimerización de la acrilamida se desencadenó añadiendo a cada una de las disoluciones 25 μ l de persulfato amónico al 10% (p/v) y 6 μ l de TEMED inmediatamente antes de verter la mezcla en el espacio comprendido entre los cristales. Dicho espacio, se rellenó hasta agotar las soluciones de acrilamida (faltando 4 cm aproximadamente para alcanzar el borde superior), cubriéndose el menisco con una capa de agua destilada. Una vez polimerizados, tras eliminar el agua, los geles se recubrieron con un gel de empaquetamiento (unos 4 cm de altura) que contenía 3% de acrilamida en 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS al 0,1% y persulfato amónico y TEMED, ambos al 0,1% (v/v). Antes que se produjese la polimerización del gel de empaquetamiento se introdujo, en la parte superior, un peine de teflón formado por 15 dientes de 6 mm de

ancho por 25 mm de altura, separados entre sí por 3 mm, para formar los pocillos para colocar las muestras. Este peine se retiró una vez el gel hubo polimerizado.

Los geles al 10% de acrilamida (16 x 20 cm, 0,75 mm grosor) se prepararon mezclando 7,67 ml de la solución de acrilamida al 30% y N'N'-Bis-metilen-acrilamida al 0,8%, 5,75 ml de tampón Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8 que contenía SDS al 0,4% y 9,518 ml de agua destilada. La polimerización se indujo añadiendo 50 μ l de persulfato amónico al 10% (p/v) y 12 μ l de TEMED inmediatamente antes de colocar la disolución entre las placas de cristal mediante una pipeta. El montaje del gel de empaquetamiento y el resto del procedimiento electroforético es análogo al descrito anteriormente para los gradientes lineales del 7,5 al 15% de acrilamida.

Las muestras de membranas plasmáticas conteniendo una concentración variable de proteína, según los experimentos, se desnaturalizaron calentándolas a 100 °C durante 5 min en Tris-HCl, 31,5 mM, pH 6,8, con SDS al 1%, glicerol al 5%, 2-mercaptoetanol al 2,5% y azul de bromofenol al 0,0025%, y, una vez enfriadas, se aplicaban (40 μ l) con una jeringuilla Hamilton en los pocillos. La electroforesis se desarrolló a 15 °C, aplicando una intensidad de corriente inicial de 25 mA, que se aumentaba a 35 mA cuando el frente de electroforesis rebasaba el gel de empaquetamiento. El tampón de electrodo utilizado fue Tris 25 mM-Glicina 192 mM con SDS al 0,1%.

En todos los geles se incluyeron muestras de patrones de proteínas de peso molecular conocido, tratadas como la muestra problema. Como patrones de pesos moleculares se utilizaron mezclas

(suministradas por BIO-RAD) de las siguientes proteínas : fosforilasa b (92,5 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31,0 kDa), inhibidor de tripsina de semilla de soja (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa). El peso molecular de las proteínas problema se determinó por interpolación en la gráfica obtenida representando el logaritmo decimal del peso molecular de las proteínas patrones frente al logaritmo decimal del porcentaje de acrilamida en el que se localiza cada proteína.

2.5.2.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaban por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomasie R-250 (2,5 g/l en una solución de metanol: acético: agua, 4:1:5, v/v) durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, los geles se lavaban repetidas veces en una solución de metanol:acético:agua, 4:1:5 (v/v) hasta que el fondo quedaba transparente. Las proteínas se visualizaban como bandas de color azul sobre fondo translucido.

2.5.2.3. Secado de geles de poliacrilamida

Para secar y conservar los geles después de la tinción con azul de Coomasie, se sumergían entre 15 y 20 min en una mezcla de glicerol:etanol:agua, 3:70:27 (v/v), hasta que su fondo adquiría un aspecto lechoso. Tras lavar los geles con glicerol al 3% en agua (v/v) durante 15 min, se incubaban en la misma solución durante 45 min más. Finalmente los geles se disponían entre dos capas húmedas de

celofán y se colocaban, sobre una placa de cristal, debajo de un ventilador para que se secaran.

2.5.2.4. Detección de proteínas marcadas en geles de SDS-poliacrilamida mediante autorradiografía

Los geles procedentes de análisis electroforético de polipéptidos de membranas plasmáticas tras fosforilación "in vitro" con ^{32}P -ATP, una vez teñidos con azul de Coomasie (sección 2.5.2.2) y secados (sección 2.5.2.3) se sometieron a análisis autorradiográfico para detectar los polipéptidos marcados con ^{32}P . Para ello, los geles se depositaron en carcasas metálicas protegidas de la luz sobre placas autorradiográficas HyperfilmTM (Amersham). Las carcasas se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h. Transcurrido este tiempo de exposición, las placas se revelaron empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por la firma comercial Valca, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de preparaciones de membranas plasmáticas incubadas con ^{14}C -PGO el procedimiento fue similar, pero tras la tinción de proteínas y antes de secar el gel, éste se trató con una solución comercial denominada EN³HANCETM (Dupont) para amplificar la señal por fluorografía.

2.5.3. Marcaje "in vitro" de polipeptidos con ^{14}C -PGO

La capacidad del PGO para marcar residuos de arginina de dominios hidrofílicos de polipéptidos de la membrana plasmática se ensayó por incubación de las membranas con el reactivo marcado radiactivamente con ^{14}C . Alícuotas de membranas plasmáticas purificadas (equivalentes a 80 μg de proteína) obtenidas a partir de células de *A. nidulans* crecidas en nitrato (sección 2.2), se incubaron con 7- ^{14}C -PGO 5 mM (666 MBq/mmol) durante 30 min en oscuridad a 37 °C. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% y, tras eliminar el sobrenadante por centrifugación (10000 g, 4 min) se resuspendieron en tampón TES-NaOH, 10 mM, pH 7, conteniendo 10 mM NaCl, sometándose, por último, a electroforesis en condiciones desnaturalizantes como se describe en la sección 2.5.2.1. El perfil polipeptídico se reveló mediante tinción con azul de Coomasie (sección 2.5.2.2), y, tras secado de los geles se detectaron las proteínas marcadas por el procedimiento descrito en la sección 2.5.2.4.

2.5.4. Determinación de clorofila *a*

La clorofila *a* se determinó espectrofotométricamente en extractos metanólicos de las células (MacKinney, 1941). Para ello, 10 μl de suspensión celular se mezclaban con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrífuga, y, tras agitar vigorosamente, el extracto se centrifugaba a 10000 g durante 1,5 min. La concentración de clorofila en el sobrenadante se determinaba midiendo su

absorbancia a 665 nm, en base a un coeficiente de extinción específico de 74,46 (mg/ml) x cm⁻¹.

2.5.5. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas en extractos celulares o preparaciones de membranas plasmáticas se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). La mezcla de reacción contenía 0,2 ml del reactivo de BIO-RAD para la estimación de proteínas, alcalinizado con NaOH 0,2 M de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y la muestra a analizar conteniendo de 0 (blanco) a 30 µg de proteína en un volumen final de 1 ml. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se determinaba la absorbancia de la mezcla a 595 nm. Para cada determinación se construía una curva patrón con cantidades conocidas de ovoalbúmina.

2.5.6. Técnicas espectrofotométricas

Las medidas espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de doble haz Pye Unicam SP 1750 UV o en un espectrofotómetro UV-Vis Hitachi U 1100, dotados con salida digital.

2.5.7. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinó con un medidor de pH Metrohm 654 pH meter provisto con salida digital o en un medidor de pH Crison micropH 2001, también con salida digital.

2.5.8. Medidas de flujos gaseosos

Para cuantificar el aire y el CO₂ que se suministra a los cultivos en las proporciones adecuadas, se utilizaron medidores de flujos gaseosos Fischer & Porter, modelo 1/8-12-G-5/36 para el aire, y modelo 1/16-20-G-5/36 para el CO₂.

2.6. REACTIVOS

Todos los reactivos para la preparación de los medios de cultivo fueron suministrados por Panreac (España), grado purísimo. Para los ensayos biológicos se utilizaron productos Merck (Alemania) y Sigma (USA) calidad para análisis. Los reactivos para electroforesis fueron suministrados por BIO-RAD (USA). Silicona Versilube F-50 era de Serva (Alemania). Monensina era de Fluka (Suiza). Amiloride, MSX, PMSF, ϵ -aminocaproico, benzamidina eran de Sigma (USA). PGO, ONB y silicona 14615-3 eran de Aldrich Chemie (Alemania). ADNasa I era de Boehringer-Manheim (Alemania). ^{14}C -PGO y ^{32}P -ATP eran de Amersham (Inglaterra). Los productos líquidos para CLAE eran de Merck (Alemania) y Scharlau (España).

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERISTICAS CINETICAS Y BIOENERGETICAS DEL TRANSPORTE DE NITRATO EN *Anacystis nidulans* R2 FM6

3.1.1. Transporte de nitrato en *Anacystis nidulans* R2 y en la estirpe mutante *Anacystis nidulans* R2 FM6

La acumulación intracelular de nitrato está determinada por el balance entre el transporte neto (entrada-salida) del ión y la reducción de nitrato vía nitrato reductasa. En condiciones en que la reducción de nitrato no es operativa, la determinación de nitrato intracelular constituye una valoración directa de la actividad de transporte.

En anteriores aproximaciones, se había determinado actividad de transporte de nitrato analizando su acumulación intracelular en dos sistemas experimentales que cumplían esta característica: a) células tratadas con wolframio, que sintetizan una nitrato reductasa inactiva (Herrero y Guerrero, 1986), ensayadas en iluminación (Lara *et al*, 1987), y b) células sin tratar, ensayadas en oscuridad, donde la reducción de nitrato *in vivo* está limitada por la disponibilidad de poder reductor (Sivak *et al*, 1989; Guerrero *et al*, 1990). Para conseguir un sistema más adecuado, en el que se eviten los efectos laterales del tratamiento con wolframio y las limitaciones energéticas impuestas por la oscuridad, se ha estudiado la capacidad de transportar nitrato en *A. nidulans* R2 FM6, una estirpe mutante carente de actividad nitrato reductasa (Madueño *et al*, 1988a).

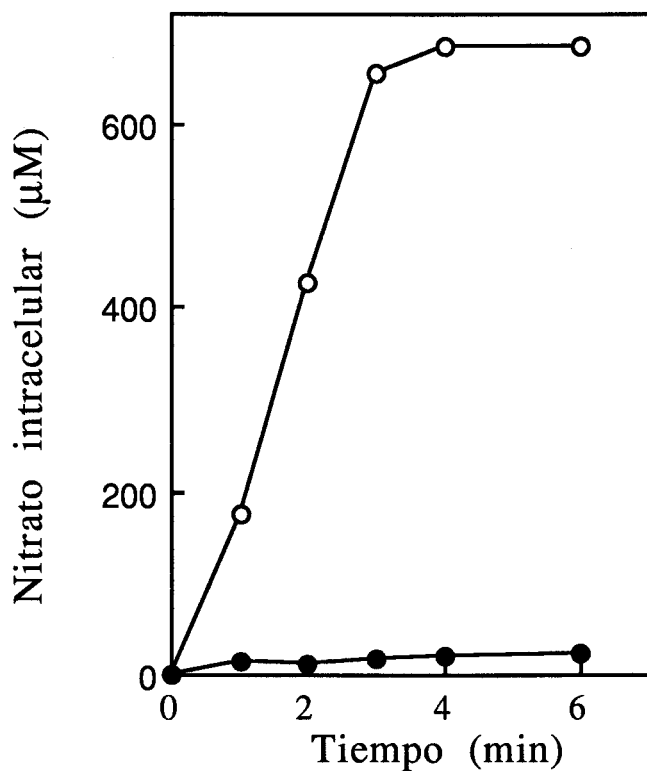
Cuando se ensayó el transporte de nitrato en células de la estirpe silvestre *A. nidulans* R2, a una concentración externa de 20 μM NaNO_3 , en condiciones de iluminación, la acumulación intracelular de nitrato era prácticamente indetectable, reflejando una situación de equilibrio dinámico en la que transporte y reducción de nitrato ocurren simultáneamente (Figura 4). Sin embargo, la estirpe mutante FM6, ensayada en las mismas condiciones, mostraba una rápida acumulación intracelular de nitrato, que aumentaba linealmente con respecto al tiempo en los primeros minutos del ensayo y alcanzaba un *plateau* a los 3-4 min, con concentraciones intracelulares de nitrato superiores a 600 μM (Figura 4).

La Figura 5 muestra el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 y en la estirpe mutante FM6, ensayadas en oscuridad, en presencia de una concentración externa de nitrato de 20 μM . El nitrato se acumuló en ambas estirpes de forma similar, hasta alcanzar un *plateau* a 4 min, aunque la velocidad de transporte de nitrato y los niveles de acumulación intracelular (200-300 μM) fueron menores que en luz. Este comportamiento análogo en la oscuridad, en que la reducción de nitrato en la estirpe silvestre está limitada por la disponibilidad de poder reductor, indica que la capacidad para transportar nitrato es similar en ambas estirpes.

Estos datos permiten concluir que la estirpe *A. nidulans* R2 FM6 es un sistema idóneo para la caracterización cinética y energética del transporte de nitrato.

Figura 4

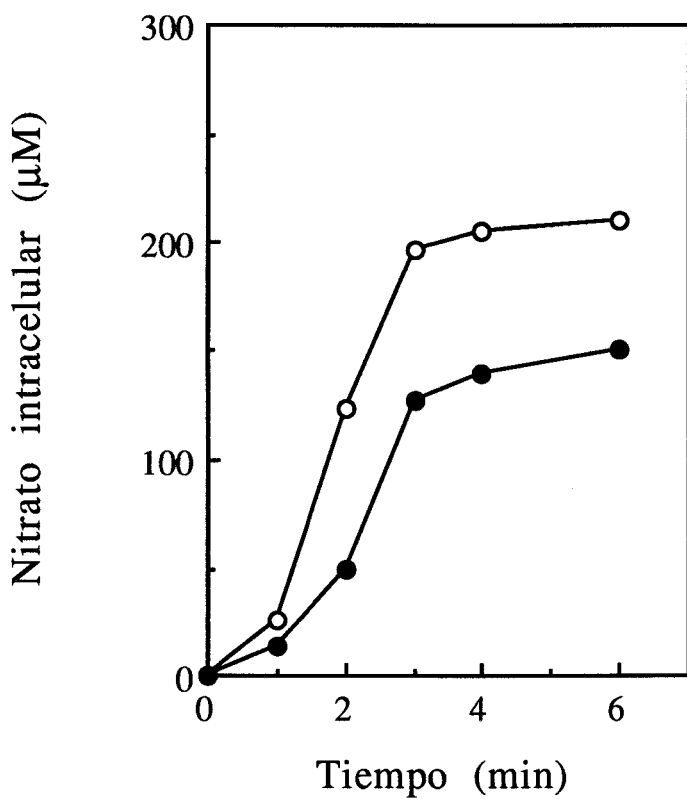
Acumulación intracelular de nitrato en células de la estirpe silvestre *A. nidulans* R2 y de la estirpe mutante FM6 ensayadas en condiciones de iluminación.



El transporte de nitrato se ensayó en condiciones de iluminación como se describe en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, con tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, con 10 mM NaHCO₃ y 20 µM NaNO₃, en la estirpe silvestre (●) y en la estirpe mutante FM6 (○).

Figura 5

Acumulación intracelular de nitrato en células de *A. nidulans* R2 y en la estirpe FM6 ensayadas en oscuridad.



El transporte de nitrato se ensayó en las mismas condiciones que en la Figura 4, en oscuridad, en la estirpe silvestre (●) y la estirpe mutante FM6 (○).

3.1.2. Termodinámica del transporte de nitrato

En una cinética típica de acumulación intracelular de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 en condiciones de iluminación, como la de la Figura 4, puede considerarse que la concentración de nitrato en el *plateau* corresponde a una situación de equilibrio dinámico entre la entrada activa de nitrato y su difusión pasiva hacia el exterior. Utilizando valores de potencial de membrana plasmática para células de *A. nidulans* en condiciones de iluminación descritos en la literatura (Paschinger, 1977, Pescheck *et al*, 1985, Ritchie, 1991), puede calcularse, mediante la ecuación de Nernst el cambio de energía libre del transporte de nitrato en nuestras condiciones experimentales.

Para:

$$[\text{NO}_3^-]_e = 20 \mu\text{M}$$

$$[\text{NO}_3^-]_i = 680 \mu\text{M}$$

$$T = 313 \text{ }^\circ\text{K}$$

$$z = -1$$

$$\Delta\phi = -0,1 \text{ V}$$

$$F = 96,487 \text{ kJ V}^{-1}\text{mol}^{-1}$$

$$R = 8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$$

$$\Delta G' = RT \ln \frac{[\text{NO}_3^-]_i}{[\text{NO}_3^-]_e} + zF\Delta\phi = +20 \text{ kJ mol}^{-1}$$

El valor de $\Delta G'$ calculado resulta de $+20 \text{ kJ mol}^{-1}$ nitrato, lo que refleja la naturaleza fuertemente endergónica del proceso de transporte de nitrato.

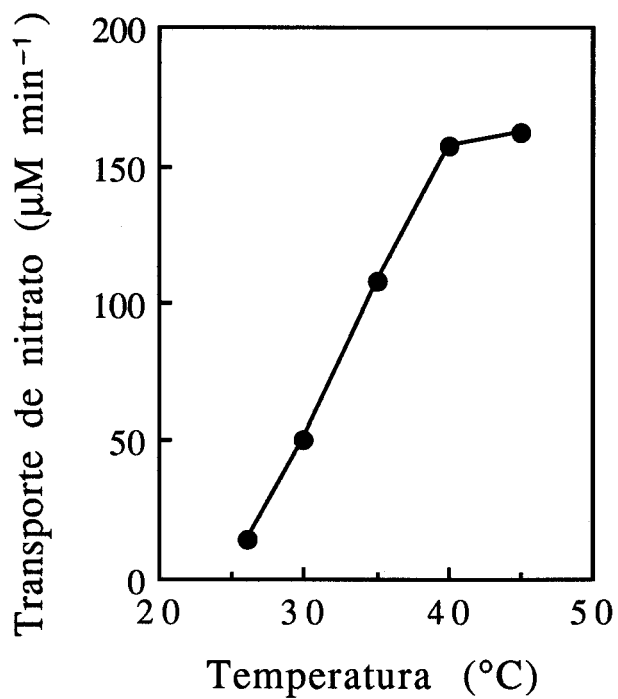
Cuando se ensayó el transporte de nitrato en *A. nidulans* R 2 FM6 en función de la temperatura (25-45 °C), se observó que la velocidad de transporte aumentaba linealmente con la temperatura hasta alcanzar un máximo a 40 °C (Figura 6), que corresponde a la temperatura a la que se cultivaba esta cianobacteria. A partir de estos datos, se calculó un valor de Q_{10} (30-40) de 3.

Aplicando la ecuación de Arrhenius a nuestras condiciones experimentales se ha calculado una energía de activación para el transporte de nitrato de $+87 \text{ kJ mol}^{-1}$ nitrato.

$$E_a = \frac{2,3RT_2T_1 \log Q_{10}}{10} = +87 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nitrato}$$

Figura 6

Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en células de *A. nidulans* R2 FM6.



Los ensayos a diferentes temperaturas se efectuaron en las condiciones de la Figura 4.

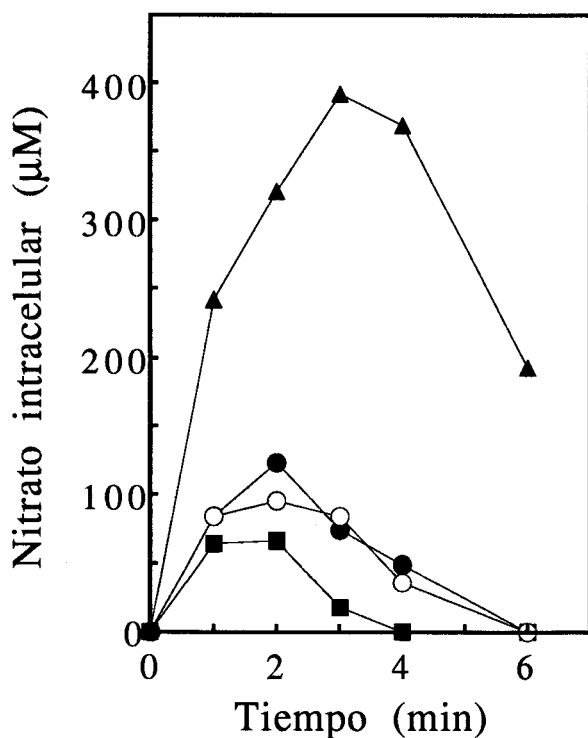
3.1.3. Requerimiento por sodio del transporte de nitrato

Se ha ensayado la dependencia por cationes monovalentes del transporte de nitrato en *Anacystis nidulans* R2 FM6. La Figura 7 muestra que el transporte de nitrato en dicha estirpe presentaba un requerimiento estricto y selectivo por Na^+ . En ausencia de cationes monovalentes añadidos, la acumulación intracelular de nitrato era escasa y transitoria. En presencia de 500 μM de Li^+ o K^+ , la acumulación intracelular de nitrato era semejante a la encontrada en ausencia de cationes añadidos. En cambio, la adición de 500 μM de Na^+ producía una estimulación importante del transporte de nitrato, cuya acumulación intracelular aumentaba rápidamente con respecto al tiempo. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la Figura 4 para concentraciones más altas de Na^+ (10 mM), no se alcanzaba un *plateau*, sino que tras 3-4 min de acumulación neta, se registraba un acusado descenso en los niveles intracelulares de nitrato. Esta disipación de la acumulación intracelular de nitrato indica la salida neta del mismo, a favor de su gradiente electroquímico, y sugiere que el transporte activo de nitrato se encuentra limitado a bajas concentraciones de Na^+ .

Efectivamente, el transporte de nitrato se afectaba sensiblemente por la monensina, un ionóforo que relaja el gradiente electroquímico de sodio (Skulachev, 1985; Brown et al, 1990). La preincubación de células con concentraciones crecientes de monensina (Figura 8) conducía a una depresión del transporte de nitrato, alcanzándose una inhibición superior al 60% para concentraciones de monensina de 2 μM . Estos datos indican que el

Figura 7

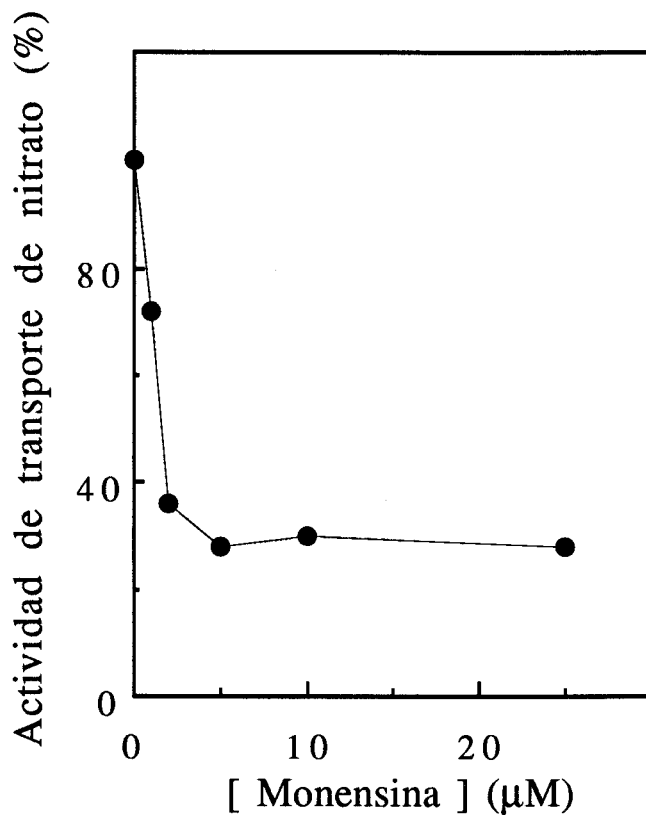
Dependencia por sodio del transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en condiciones de iluminación, en tampón Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3, con 20 µM HNO₃, en ausencia de cationes monovalentes añadidos (○) o en presencia de 500 µM LiCl (●), 500 µM NaCl (▲) ó 500 µM KCl (■).

Figura 8

Inhibición por monensina de la acumulación intracelular de nitrato en células de *A. nidulans* R2 FM6



Los ensayos de transporte de nitrato se efectuaron en las mismas condiciones que en la Figura 4. El tratamiento con monensina a las concentraciones indicadas se realizó como se describe en la sección 2.3.4 de Materiales y Métodos. El 100% de actividad correspondía a una acumulación intracelular de nitrato de 1480 μM a los 5 min de ensayo.

transporte activo de nitrato depende del mantenimiento del gradiente electroquímico de sodio a través de la membrana plasmática, el cual podría representar la fuente directa de energía para el transporte de nitrato.

El origen del gradiente electroquímico de sodio a través de la membrana plasmática en cianobacterias es objeto de controversia. Algunos autores proponen que este gradiente se forma a expensas del $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, mediante la operación de un antiporte Na^+/H^+ (Paschinger, 1977, Nitschman *et al*, 1982, Blumbald *et al*, 1984, Scherer *et al*, 1984, Molitor y Peschek, 1985). Otros autores, en cambio, proponen que se forma a expensas de bombas primarias de sodio dependientes de ATP o de luz (Batterton y van Baalen, 1971, Brown *et al*, 1990), en cuyo caso, la operatividad del antiporte Na^+/H^+ sería a la inversa, es decir, importando sodio, y excretando protones (Ritchie, 1992a). Esta propuesta es, en principio, consistente con los valores de $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ (aproximadamente 0) y $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ (aproximadamente -10 kJ mol^{-1}) determinados en células de *A. nidulans* a pH alcalino e iluminación (Ritchie, 1992a).

Para determinar si el antiporte Na^+/H^+ está implicado en la formación del gradiente electroquímico de sodio requerido para la operatividad del sistema de transporte de nitrato, se ensayó el efecto del amiloride sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6. El amiloride es un potente inhibidor del antiporte Na^+/H^+ y de canales de sodio en células animales, con I_{50} de 0,35 y 84 μM , respectivamente, (Paris y Pouyssegur, 1983, Moolenaar *et al*, 1984, Kleyman y Cragoe, 1990), células vegetales (Blumwald *et al*, 1987),

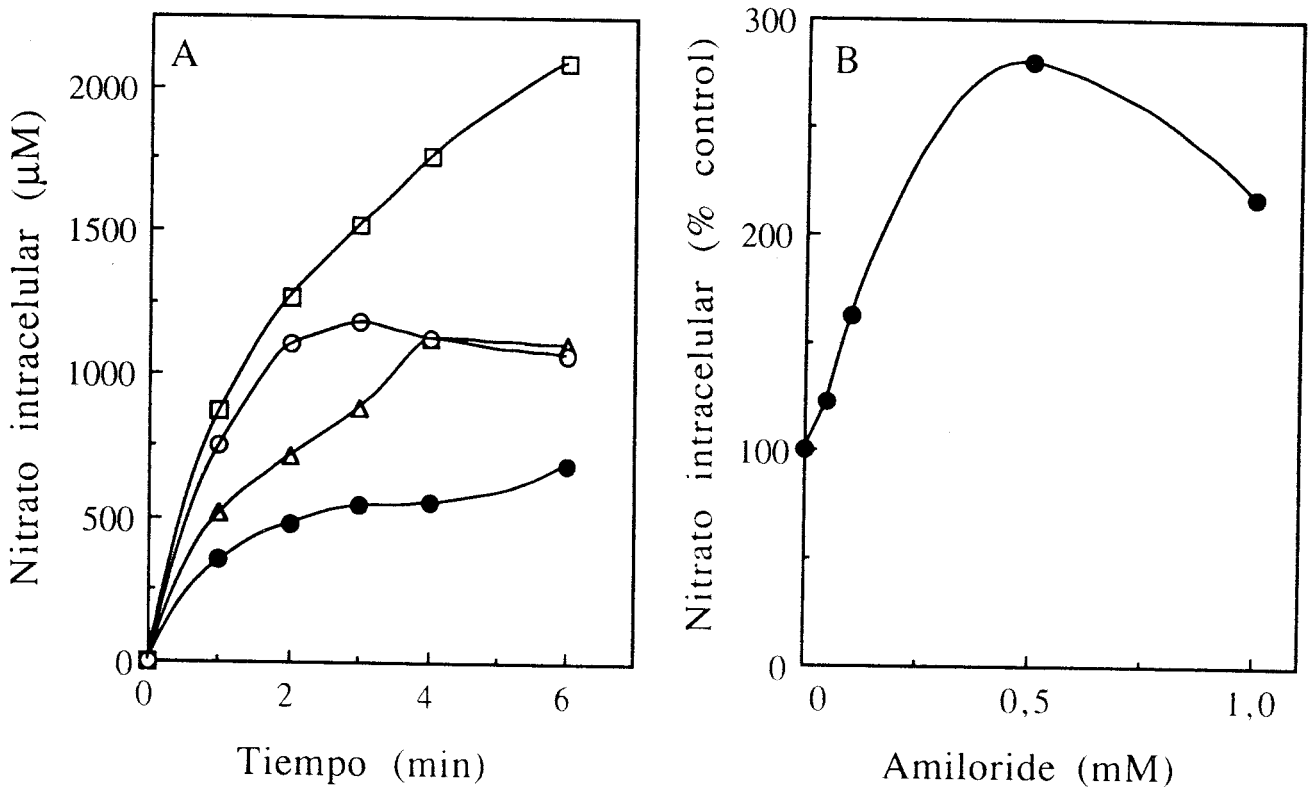
bacterias (Mochizuki-Oda y Oosawa, 1985) y cianobacterias (Kaplan *et al*, 1989).

Como muestra la Figura 9, a concentraciones bajas de amiloride se producía una fuerte estimulación de la velocidad inicial de transporte así como de la acumulación intracelular de nitrato, siendo ésta máxima (casi tres veces superior al control) a 0,5 mM de amiloride. A concentraciones más altas de amiloride, la estimulación decaía, aunque a 1 mM el amiloride todavía producía un efecto positivo sobre el transporte de nitrato.

Si el antiporte Na^+/H^+ fuese responsable del establecimiento del gradiente electroquímico de Na^+ cabría esperar que al inhibir dicho antiporte se inhibiera también el transporte de nitrato. El amiloride, a concentraciones en exceso a las requeridas para inhibir los antiportes Na^+/H^+ descritos, no sólo no inhibe el transporte de nitrato sino que por el contrario lo estimula. Estos resultados sugieren que el el antiporte Na^+/H^+ no está implicado en la generación del gradiente electroquímico de Na^+ en *A. nidulans* R2 FM6 y, posiblemente, tanto el antiporte Na^+/H^+ como el transporte de nitrato actuen como consumidores de la energía del gradiente electroquímico de Na^+ y compitan por él para su funcionamiento. Al inhibir el amiloride el antiporte Na^+/H^+ , el transporte de nitrato se estimularía porque dispondría de mayor cantidad de energía.

Figura 9

Estimulación por amiloride del transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6



Los ensayos de transporte de nitrato se efectuaron en las mismas condiciones que en la Figura 4. (A) Cinética de acumulación intracelular de nitrato respecto al tiempo en ausencia (●) o presencia de 0,1 mM (Δ), 0,5 mM (\square) y 1 mM (○) amiloride. (B) Dependencia de la acumulación intracelular de nitrato respecto a la concentración de amiloride. Se representa el nitrato acumulado en tres minutos de ensayo. El 100% corresponde a una acumulación intracelular de nitrato de 540 μM .

3.1.4. Análisis cinético del transporte de nitrato

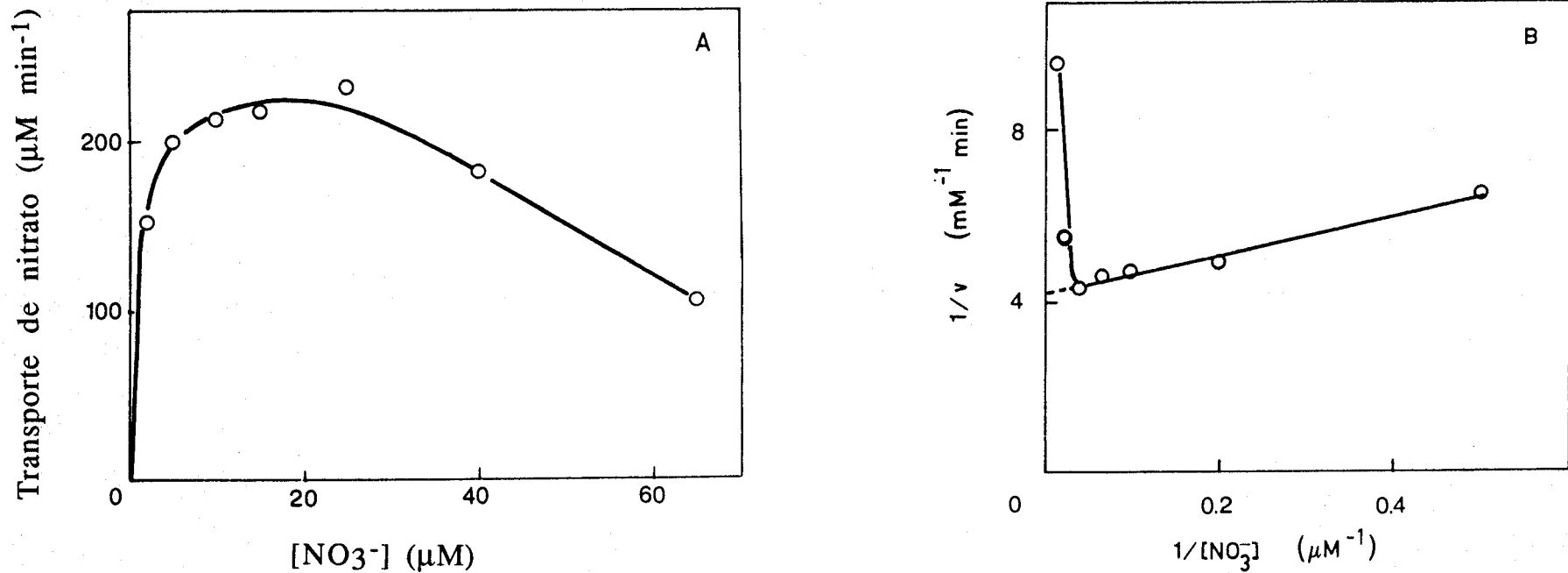
Cuando se ensayó la velocidad de transporte de nitrato en función de la concentración externa de nitrato en condiciones de iluminación, se observó que la velocidad inicial aumentaba de forma hiperbólica al hacerle la concentración de nitrato, hasta alcanzar un máximo a 20-25 μM , a partir del cual decrecía para concentraciones más altas del ión (Figura 10A).

Es oportuno señalar que, como norma general, en los resultados presentados en este apartado se han calculado las velocidades iniciales de transporte de nitrato como la media determinada durante los 2 primeros minutos de ensayo, y como concentración inicial, se ha considerado la media entre la que existía a tiempo cero y tras 2 minutos de ensayo, siguiendo la recomendación de Segel (1975) para sistemas en que el sustrato se consume rápidamente en los primeros momentos de la reacción. En nuestro caso, en ensayos con bajas concentraciones de nitrato, una buena parte de éste se consumía rápidamente. Como ejemplo, en los ensayos de la Figura 10 se consumía desde un 50% a 2 μM nitrato a un 7% a 20 μM nitrato, después de 2 min de ensayo. Con la corrección aplicada puede paliarse el error introducido por este hecho (Segel, 1975).

El patrón cinético de la Figura 10 es típico de una inhibición por sustrato, que se manifestaba en la representación de dobles inversos como una desviación de los puntos hacia el eje vertical, a concentraciones altas de nitrato (Figura 10B). Considerando la zona lineal de la gráfica se calculó una K_s aparente para nitrato de 1 μM ,

Figura 10

Dependencia de la velocidad inicial de transporte de nitrato respecto a la concentración externa de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 en condiciones de iluminación



El transporte de nitrato se realizó como se describe en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, con NaHCO_3 10 mM y diferentes concentraciones de NaNO_3 en condiciones de iluminación. Representación directa (A), y representación de dobles inversos (B) de los datos.

que refleja la gran afinidad del transportador de nitrato por su sustrato.

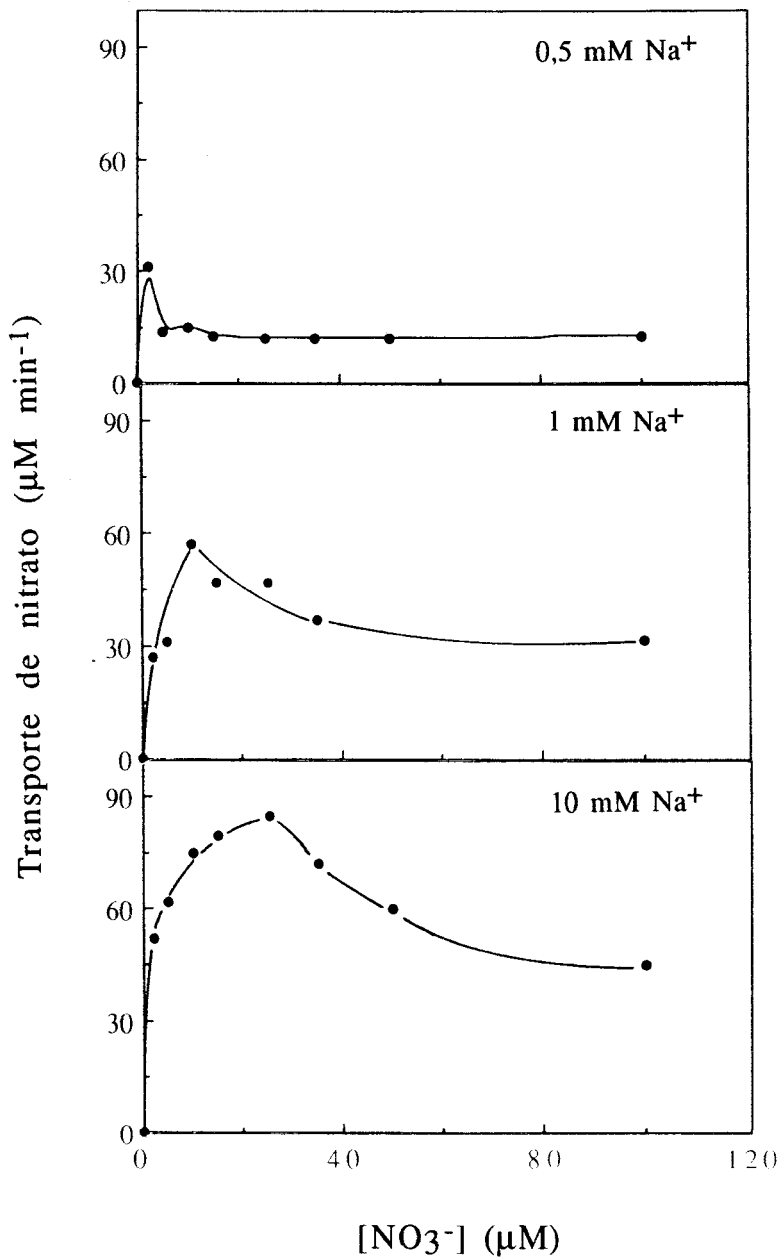
Es interesante mencionar que la concentración intracelular de nitrato no tenía efecto aparente sobre la velocidad inicial de transporte, lo que indica una ausencia de una inhibición por producto (datos no mostrados).

El requerimiento por Na^+ del transporte de nitrato descrito anteriormente permitiría explicar la inhibición por sustrato de dicho transporte en términos de un simporte $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$. La inhibición aparente por sustrato es un fenómeno bastante frecuente en enzimas y transportadores bisustratos, en especial en sistemas en los que están implicados iones metálicos (London y Steck, 1969, Segel, 1975, Cleland, 1979, Morrison, 1979). Para determinar si este es el caso y caracterizar el mecanismo de transporte se ha ensayado la actividad de transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 en función de la concentración de nitrato a varias concentraciones de sodio y, a la inversa, se ha ensayado la actividad de transporte en función de la concentración de sodio a distintas concentraciones de nitrato, siempre en condiciones de iluminación.

La Figura 11 muestra la velocidad inicial de transporte de nitrato en función de su concentración externa a concentraciones de Na^+ de 0.5, 1 y 10 mM, añadido como cloruro. En todos los casos, la velocidad de transporte de nitrato aumentaba al hacerlo la concentración externa del mismo hasta alcanzar un máximo de velocidad, para disminuir posteriormente a concentraciones superiores de nitrato. A medida que la concentración externa de sodio añadido era más alta, el máximo de velocidad observado

Figura 11

Dependencia de la velocidad inicial de transporte de nitrato con respecto a la concentración externa de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 a distintas concentraciones de sodio



El transporte de nitrato se ensayó como se describe en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tris-Tricina 25 mM, pH 8,3, con diferentes concentraciones de nitrato, en presencia de 0,5, 1 y 10 mM de NaCl, en condiciones de iluminación.

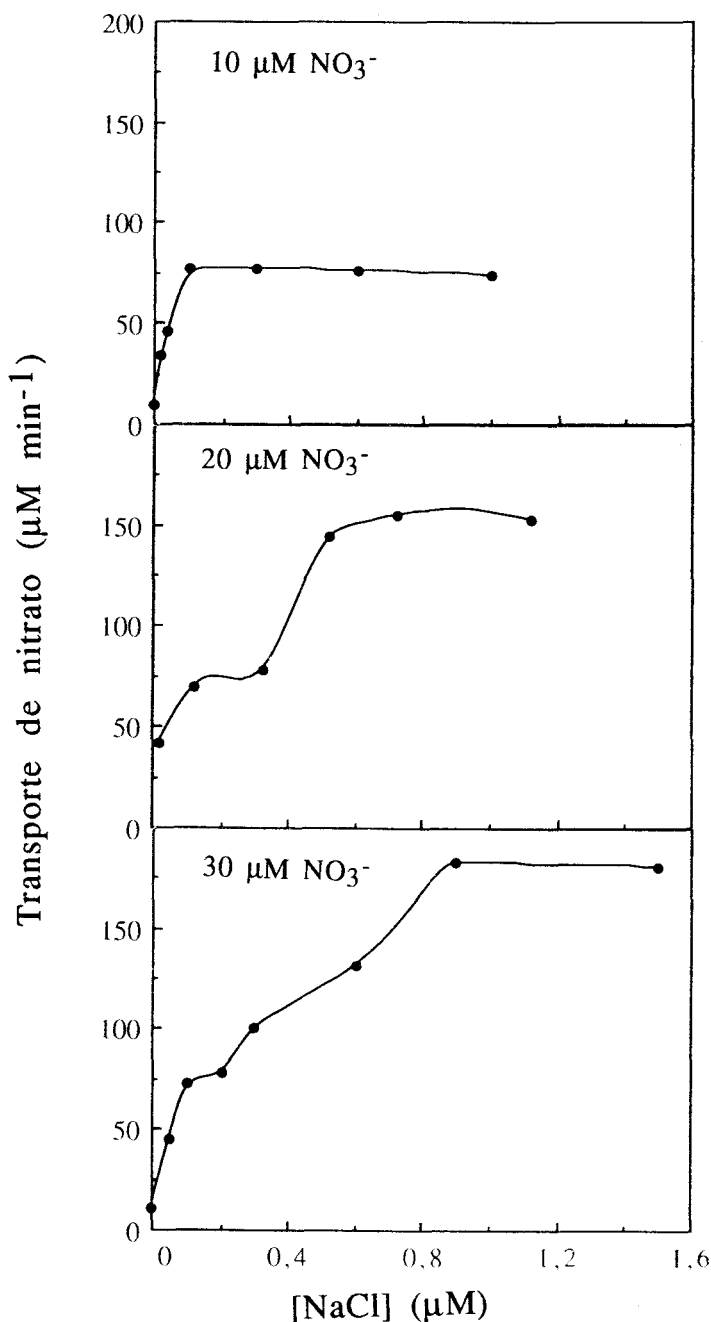
aumentaba en magnitud y se iba desplazando progresivamente hacia concentraciones superiores de nitrato. Así, cuando la concentración de Na^+ era de 0.5 mM el máximo de velocidad se localizaba para una concentración de 5 μM de nitrato, mientras que a 1 mM de Na^+ se alcanzaba a 10 μM nitrato, y, cuando la concentración externa de Na^+ era de 10 mM este máximo de velocidad se localizaba a 25 μM nitrato, tanto si el Na^+ se añadía como cloruro (Figura 11) o como bicarbonato (Figura 10). En todos los casos es evidente que para cada concentración de nitrato la velocidad de transporte aumentaba progresivamente al aumentar la concentración de sodio añadido. Para concentraciones supraóptimas de nitrato, la velocidad se estabilizaba en torno a 15 $\mu\text{M min}^{-1}$ a 0,5 mM Na^+ , 35 $\mu\text{M min}^{-1}$ a 1 mM Na^+ y 45 $\mu\text{M min}^{-1}$ a 10 mM Na^+ .

En la figura 12 se representa la velocidad inicial de transporte de nitrato en función de la concentración externa de sodio a 10, 20 y 30 μM nitrato. Cuando la concentración externa de nitrato era baja (10 μM), el perfil de la curva de velocidad mostraba una cinética de saturación simple con respecto a la concentración de sodio. A concentraciones superiores de nitrato (20 μM), el perfil era más complejo, con doble concavidad. A 30 μM nitrato, la interfase entre las dos zonas cóncavas anteriores se suavizaba y se alcanzaba la saturación a concentraciones más altas de Na^+ (Figura 12).

Estas cinéticas complejas de las Figuras 11 y 12 se ajustan a un modelo desarrollado por London y Steck (1969) para enzimas bisustrato en las que interaccionan el sustrato y un catión metálico activador de la catálisis. Entre los diferentes modelos cinéticos desarrollados por estos autores dependiendo de si el ión activador es

Figura 12

Efecto de la concentración externa de sodio sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 a diferentes concentraciones de nitrato



El transporte de nitrato se ensayó como se describe en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3, a diferentes concentraciones de NaCl, a 10, 20 y 30 $\mu\text{M HNO}_3$, en condiciones de iluminación.

esencial o no para la catálisis, nuestras cinéticas se ajustan mejor al caso particular en que el complejo sustrato-cación se une al centro activo y el catión se comporta además como un activador no esencial (London y Steck, 1969, Segel, 1975). De acuerdo con este modelo, nuestros datos sugerirían un mecanismo de reacción en el que el nitrato sódico sería el verdadero sustrato para el transportador y en el que el Na^+ actuaría además como un activador no esencial para la catálisis. El mecanismo de reacción para el transporte de nitrato en *Anacystis* se detalla y discute en la Discusión de este trabajo.

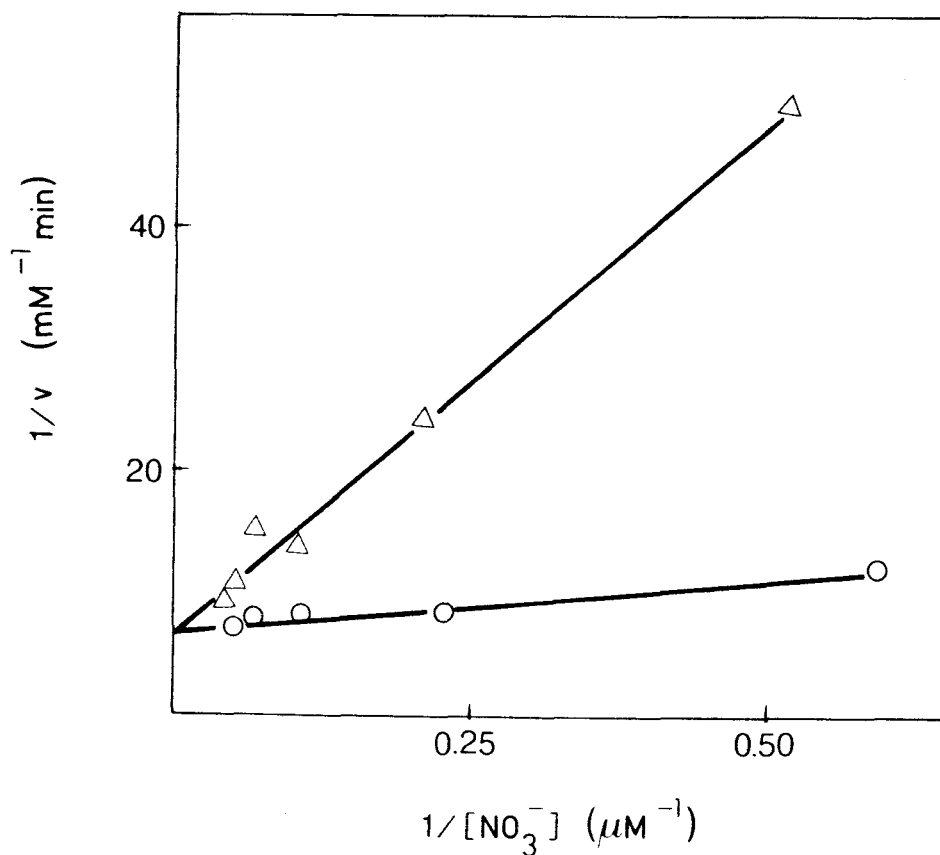
3.1.5. Inhibición por nitrito del transporte de nitrato

El nitrito, una fuente de nitrógeno alternativa para las cianobacterias, se comporta como inhibidor competitivo del transporte de nitrato. La Figura 13 muestra la representación de dobles inversos de velocidad inicial de transporte frente a distintas concentraciones de nitrato, inferiores a $25 \mu\text{M}$ que resultan ya inhibitorias, en ausencia y presencia de $30 \mu\text{M}$ nitrito. Se observa que en ambos casos la V_{max} es la misma, lo que indica que la inhibición por nitrito es de tipo competitivo (Figura 13). Se ha estimado un valor de $K_{i(\text{nitrito})}$ del transporte de nitrato de $3 \mu\text{M}$. Este resultado indica que el nitrito se une al transportador con una alta afinidad, análoga a la que muestra el transportador por el nitrato ($K_{s(\text{nitrato})} 1 \mu\text{M}$).

Cuando se ensayó el transporte de nitrato a una concentración externa fija de nitrato de $20 \mu\text{M}$, en presencia de concentraciones crecientes de nitrito (Figura 14), se observó que la inhibición por

Figura 13

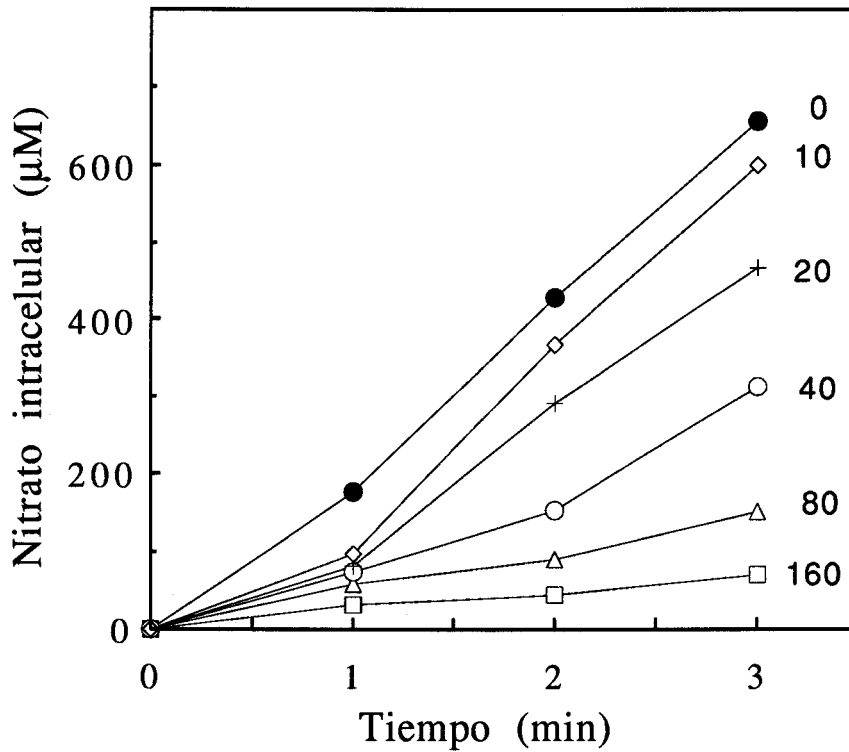
Inhibición por nitrito de la velocidad inicial del transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 en condiciones de iluminación.



Representación de dobles inversos de velocidad inicial de transporte de nitrato frente a concentración de nitrato en ausencia (○) o presencia (Δ) de $30 \mu\text{M}$ KNO_2 . El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, NaHCO_3 10 mM y diferentes concentraciones de NaNO_3 , en condiciones de iluminación.

Figura 14

Dependencia de la acumulación intracelular de nitrato con respecto a la concentración de nitrito en *A. nidulans* R2 FM6



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, NaHCO₃ 10 mM y 20 µM NaNO₃, en condiciones de iluminación, en ausencia o presencia de las concentraciones (µM) de KNO₂ indicadas.

nitrito del transporte de nitrato a concentraciones de nitrito inferiores a 40 μM era más marcada en los primeros minutos del ensayo, alcanzándose después velocidades muy similares a la del control. A concentraciones de nitrito superiores a 40 μM , la inhibición se mantenía durante todo el ensayo. Este comportamiento es típico de sistemas que presentan inhibición competitiva por sustratos alternativos (Segel, 1975). A bajas concentraciones de nitrito, éste se transportaría y metabolizaría rápidamente, alcanzándose a tiempos más largos velocidades de transporte de nitrato similares a las observadas en ausencia de nitrito. Sólo a altas concentraciones de nitrito se manifestaría la inhibición durante todo el ensayo. Estos resultados indican que nitrato y nitrito podrían ser transportados por el mismo sistema en *A. nidulans*.

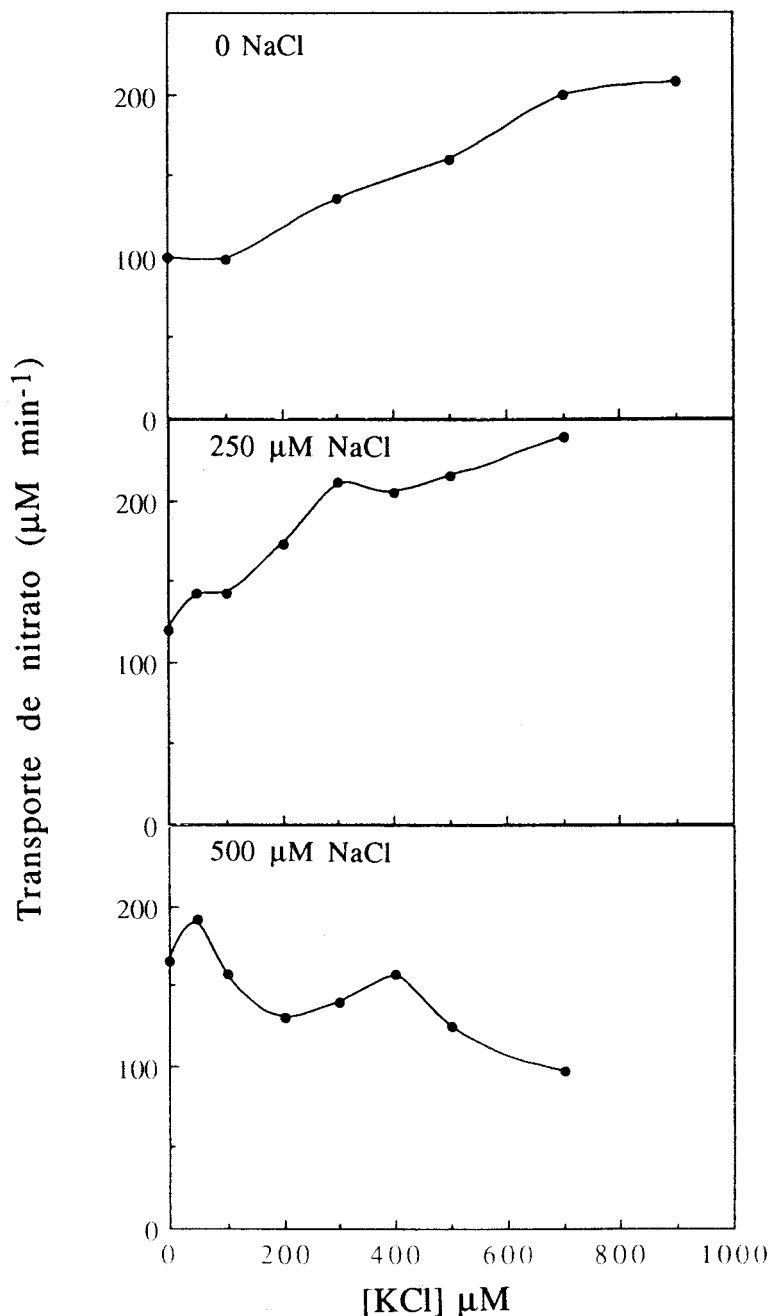
3.1.6. Efecto del K^+ sobre el transporte de nitrato

Para determinar si el K^+ pudiera tener un efecto antagonista al del Na^+ sobre el transporte de nitrato, se ha ensayado la actividad de transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 en función de la concentración externa de KCl , en ausencia o presencia de distintas concentraciones de NaCl .

En ausencia de Na^+ añadido o cuando la concentración de Na^+ era muy baja (250 μM), se observaba un estímulo por K^+ del transporte de nitrato (Figura 15), aunque el incremento de la velocidad era muy inferior al que producía el Na^+ a las mismas concentraciones (Figura 12). En cambio, cuando la concentración de Na^+ en el ensayo era de 500 μM se observó que la velocidad de

Figura 15

Efecto de la concentración externa de potasio sobre la velocidad inicial de transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 a distintas concentraciones de sodio



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3, HNO_3 20 μM y a distintas concentraciones de KCl, en ausencia o presencia de 250 ó 500 μM NaCl y en condiciones de iluminación.

transporte disminuía al aumentar la concentración de potasio en el medio, resultando el K^+ inhibidor del transporte de nitrato.

Estos resultados indican que el K^+ actúa de forma diferente sobre el transporte de nitrato dependiendo de la concentración de Na^+ presente en el medio de ensayo, de modo que cuando no hay sodio o su concentración es baja, el potasio estimula el transporte de nitrato, posiblemente sustituyendo al sodio, pero a concentraciones mayores de sodio, el potasio muestra un efecto inhibitorio que puede deberse a competencia entre los dos cationes.

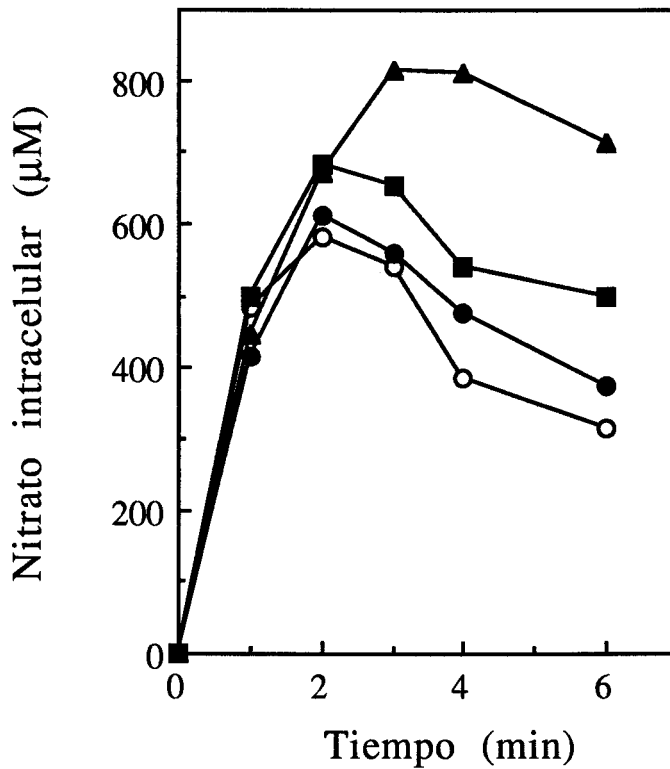
3.1.7. Transporte de nitrato en presencia de clorato

El clorato es un análogo estructural del nitrato. En raíces de cebada y maíz (Deane-Drumond y Glass, 1982, McClure *et al*, 1986) y en células del alga *Chara coralina* (Deane-Drumond, 1984), en los que se han realizado estudios de transporte de nitrato utilizando clorato marcado radiactivamente como sustrato, existen evidencias de que clorato y nitrato pueden ser transportados por un mismo sistema.

Al ensayar el transporte de nitrato en presencia de distintas concentraciones de clorato en la estirpe FM6 de *Anacystis* R2 (Figura 16), se observó que, contrariamente a lo esperado, la velocidad inicial de transporte de nitrato no se afectaba por la presencia de clorato en un intervalo entre 0,1 y 10 mM, para concentraciones externas de nitrato de 20 μ M. En algunos experimentos, tal como el de la Figura 16, incluso se observó una ligera estimulación en la

Figura 16

Efecto del clorato sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6.



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1, en tampón Tris-Tricina, 25 mM, pH 8,3 y NaNO₃ 20 µM, en ausencia de NaClO₃ (○) o en presencia de 0,2 mM (●); 2 mM (■) y 10 mM NaClO₃ (▲), en condiciones de iluminación. La concentración total de Na⁺ se mantuvo constante (10 mM), añadiendo en cada caso la concentración de NaCl necesaria.

acumulación intracelular de nitrato al aumentar la concentración de clorato.

Estos datos ponen de manifiesto que el clorato, incluso a concentraciones 500 veces superiores a la de nitrato, no inhibe el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6, por lo que ambos iones difícilmente podrían utilizar un sistema común de transporte.

3.1.8. Otros inhibidores del transporte de nitrato

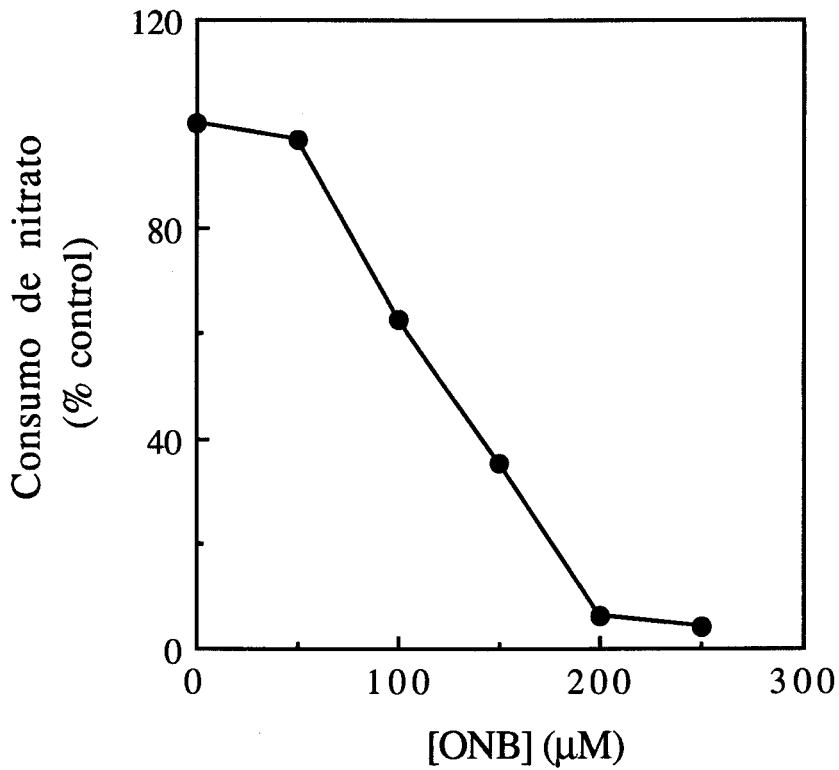
3.1.8.1. Inhibición reversible por orto-nitrobenzaldehido

El *orto*-nitrobenzaldehido (ONB), compuesto orgánico cuyo grupo nitro es un análogo estructural del nitrato, se ha descrito como inhibidor competitivo del consumo de nitrato en el alga verde *Chlorella sorokiniana* (Tischner y Lorenzen, 1981). El ONB también es capaz de inhibir efectivamente el consumo de nitrato en *A. nidulans* (Figura 17), con inhibición prácticamente total del proceso a 250 μM de ONB, concentración igual a la de nitrato utilizada en el ensayo. En estas condiciones se estimó una I_{50} próxima a 120 μM (Figura 17). Si tras la preincubación de células de *A. nidulans* con 200 μM ONB durante 10 min en oscuridad, se eliminaba éste por lavado de las células, se observaban velocidades de consumo de nitrato muy similares a los controles sin tratar (Tabla II). Estos resultados indican que el ONB es un inhibidor reversible del consumo de nitrato en *A. nidulans*.

La inhibición por ONB del consumo de nitrato se ejerce a nivel de transporte. La Figura 18 muestra que la acumulación intracelular

Figura 17

Efecto del ONB sobre el consumo de nitrato en *A. nidulans*



Células de *A. nidulans* equivalentes a 10 µg cl *a*/ml se incubaron 10 min en oscuridad a 40 °C con distintas concentraciones de ONB antes de ensayar el consumo de nitrato como se indica en la sección 2.3.2 de Materiales y Métodos. El 100% de actividad correspondía a una velocidad de consumo de nitrato de 46 µmoles mg⁻¹cl h⁻¹.

Tabla II

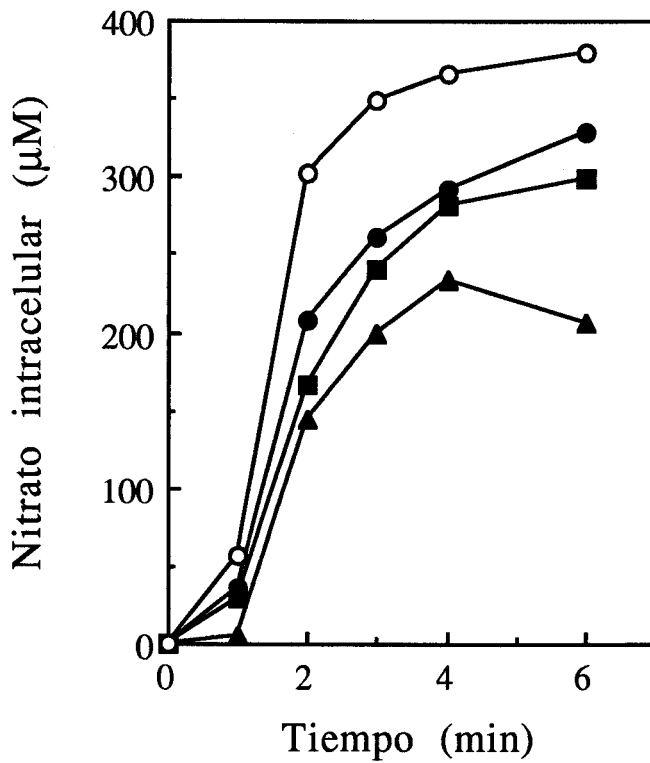
Reversibilidad del efecto inhibitor del ONB sobre el consumo de nitrato en células de *A. nidulans*

Presencia de ONB		Consumo de nitrato ($\mu\text{mol nitrato mg}^{-1}\text{cl h}^{-1}$)
Incubación	Ensayo	
-	-	32
+	+	3
+	-	36

Células de *A. nidulans* equivalentes a $10 \mu\text{g cl a/ml}$ se incubaron 10 min en oscuridad en ausencia o presencia de $200 \mu\text{M ONB}$. Tras la incubación, las células se lavaron, se resuspendieron en medio de ensayo sin ONB o con $200 \mu\text{M}$ de ONB y se ensayó el consumo de nitrato como se describe en la sección 2.3.2 de Materiales y Métodos.

Figura 18

Inhibición por ONB del transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6



Células equivalentes a 33 µg cl *a*/ml se incubaron 10 min en oscuridad a 40 °C en ausencia (○) o presencia de: 50 µM ONB (●); 150 µM ONB (■); 200 µM ONB (▲). Transcurrido dicho tiempo se ensayó el transporte de nitrato en las mismas condiciones que en la Figura 4.

de nitrato descendía notablemente tras la incubación de células de *A. nidulans* R2 FM6 con concentraciones entre 50 y 200 μM de ONB. El tipo de cinética observado también sugiere que el ONB podría ser transportado al interior celular por el transportador de nitrato, como sustrato alternativo.

3.1.8.2. Inhibición irreversible por Fenilglioxal

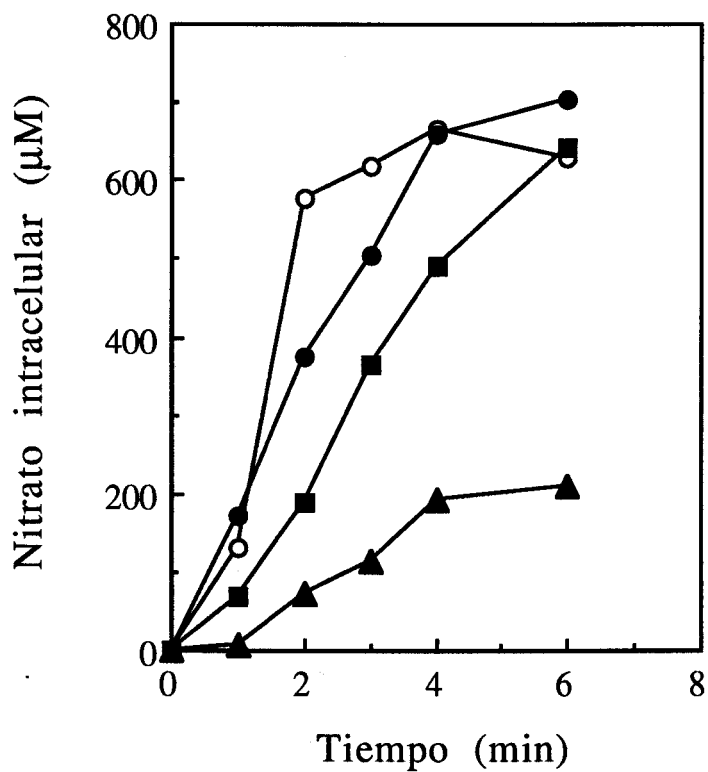
El fenilglioxal (PGO), un reactivo que se une al grupo guanidinio de restos de arginina, está descrito como un inhibidor excelente e irreversible del consumo de nitrato en raíces de maíz (Dhugga *et al*, 1988). Tras el tratamiento con PGO, el consumo de nitrato se recuperaba después de 3 h, período que coincidía con el necesario para inducir el sistema de consumo de nitrato. Estos datos eran consistentes con la idea de que el PGO se une covalentemente a las proteínas, y sugerían que restos de arginina eran esenciales para la función de transporte (Dhugga *et al* 1988).

Con estos antecedentes, se ensayó el efecto del PGO sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6. La Figura 19 muestra cómo al aumentar la concentración de PGO se producía una disminución gradual de la velocidad de transporte, así como de la acumulación final de nitrato. Concentraciones de 5 mM PGO inhibieron al 50% la velocidad de transporte de nitrato respecto al control sin tratar, y obtuviéndose inhibiciones próximas al 90% para concentraciones de PGO de 10 mM.

Cuando tras un pretratamiento con PGO, se eliminaba éste por lavado de las células inmediatamente antes del ensayo de transporte

Figura 19

Inhibición del transporte de nitrato por PGO en *A. nidulans* R2 FM6



Células equivalentes a $33 \mu\text{g cl a/ml}$ se incubaron 30 min en oscuridad, en ausencia (○) o presencia de: 1 mM PGO (●); 5 mM PGO (■) y 10 mM PGO (▲). Tras la preincubación, se ensayó el transporte de nitrato en las mismas condiciones de la Figura 4.

de nitrato, la inhibición se mantenía, resultando velocidades de transporte similares a las observadas en presencia de PGO (Tabla III). Estos resultados indican que el PGO es un inhibidor irreversible del transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 y sugieren un papel esencial de algun(os) resíduo(s) de arginina en el transporte de nitrato.

A fín de establecer un control del efecto del PGO sobre otros procesos celulares relacionados con el transporte de nitrato, se ha ensayado el efecto del PGO sobre la capacidad fotosintética de *A. nidulans*, medida como desprendimiento de O₂ dependiente de CO₂ (Tabla IV). Este proceso resultó también sensible al PGO, pero a concentraciones superiores a las necesarias para inhibir el transporte de nitrato. Así, la preincubación de células de *A. nidulans* con 5 mM PGO prácticamente no afectó al desprendimiento de O₂ dependiente de CO₂ (91% respecto al control), mientras que sí inhibió en un 50% el transporte de nitrato, lo que indica que la inhibición del transporte de nitrato no es consecuencia de un envenenamiento fotosintético o de inhibición de la fijación de CO₂, sino que es relativamente específica del mismo.

Tabla III

Irreversibilidad del efecto del PGO sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6

Presencia de PGO		Transporte de nitrato ($\mu\text{M min}^{-1}$)
Incubación	Ensayo	
-	-	254
+	+	70
+	-	114

Células de *A. nidulans* R2 FM6 equivalentes a 33 $\mu\text{g cl a/ml}$ se incubaron durante 30 min en oscuridad en ausencia o en presencia de PGO 10 mM. Transcurrido dicho tiempo, las células se lavaron y se ensayó el transporte de nitrato sin PGO o con 10 mM PGO. El transporte de nitrato se efectuó en las condiciones de la Figura 4.

Tabla IV

Efecto del PGO sobre la producción fotosintética de O₂ dependiente de CO₂ en *A. nidulans*.

[PGO] (mM)	Producción de O ₂ dependiente de CO ₂	
	μmol de O ₂ mg ⁻¹ cl h ⁻¹	% control
0	175	100
1	232	132
5	159	91
10	107	39

Células de *A. nidulans* equivalentes a 10 μg cl *a*/ml se incubaron 30 min a 40 °C en oscuridad con las concentraciones de PGO indicadas. Transcurrido dicho tiempo, se midió el desprendimiento de O₂ dependiente de CO₂ en presencia de 10 mM NaHCO₃, según se indica en la sección 2.3.3 de Materiales y Métodos. Estos datos son la media aritmética de tres experimentos independientes.

3.2. REGULACION DEL TRANSPORTE DE NITRATO POR LA FUENTE DE NITROGENO

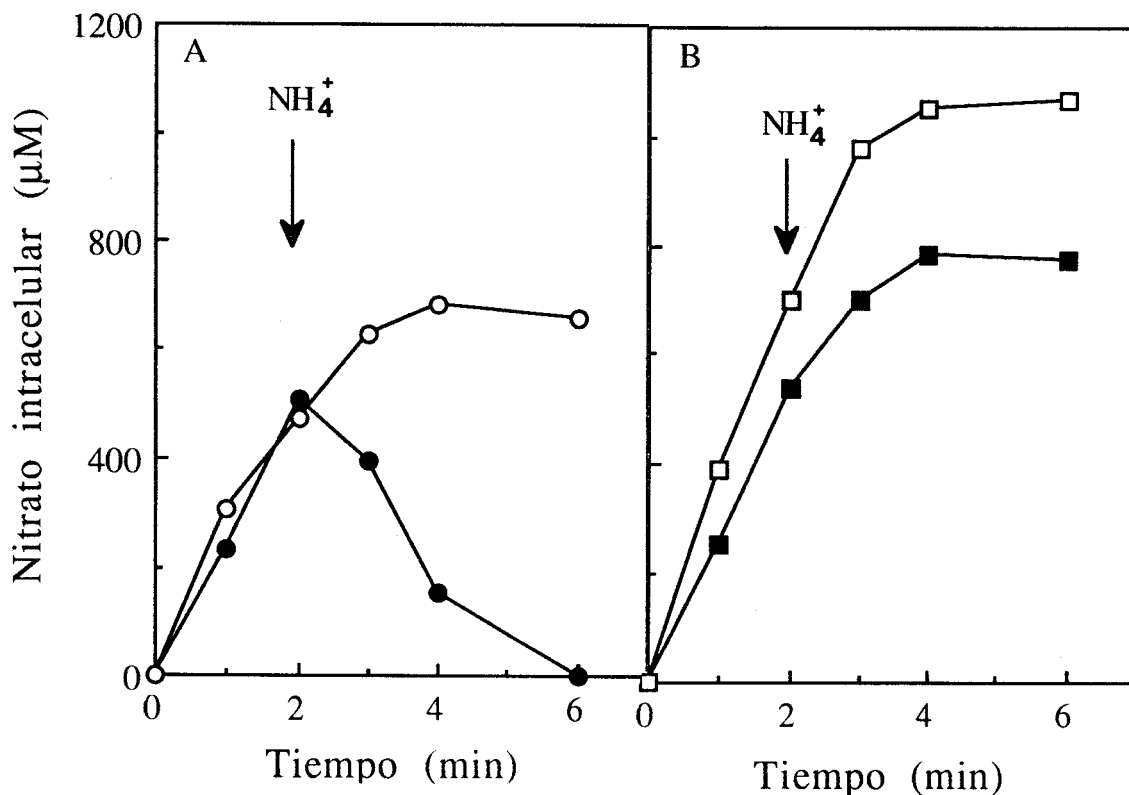
3.2.1. Inhibición por amonio del transporte de nitrato en la estirpe *Anacystis nidulans* R2 FM6

Es un hecho conocido y contrastado que el consumo de nitrato en cianobacterias se inhibe drásticamente y efectivamente por la presencia de amonio en el medio, estando dicha inhibición mediada por productos derivados de su asimilación, habiéndose propuesto que el blanco de esta retroinhibición sería la de entrada de nitrato al interior celular (Flores *et al*, 1983c, Guerrero y Lara, 1987). Efectivamente, la adición de amonio a células de *A. nidulans* tratadas con wolframio, inhibe totalmente la actividad de transporte de nitrato, y el tratamiento con MSX, un inhibidor de la asimilación de amonio, previene de esta inhibición (Lara *et al*, 1987).

La cinética de inhibición por amonio del transporte de nitrato en la estirpe FM6 se muestra en la Figura 20. La adición de 0,25 mM NH_4Cl a células de *A. nidulans* R2 FM6 transportando activamente nitrato, producía la detención prácticamente instantánea de la acumulación intracelular de nitrato y la salida del nitrato acumulado, alcanzándose niveles intracelulares indetectables 3 min después de la adición del amonio (Figura 20A). Cuando las células se habían pretratado con 1 mM MSX, la adición de amonio no tuvo ningún efecto negativo sobre el transporte de nitrato (Figura 20B). Estos datos confirman la rapidez y efectividad de la inhibición por

Figura 20

Inhibición por amonio del transporte de nitrato en células de *A. nidulans* R2 FM6 y prevención del efecto por tratamiento con MSX.



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en condiciones de iluminación, en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, 10 mM NaHCO_3 y 20 μM NaNO_3 . Células equivalentes a 33 μg cl *a*/ml se preincubaron en oscuridad durante 15 min en ausencia de MSX (A) o en presencia de 1 mM MSX (B). Transcurrido dicho tiempo se ensayó el transporte de nitrato. En el momento indicado con la flecha, se añadió ClNH_4 0,25 mM a las mezclas de ensayo en ● y ■.

amonio del transporte de nitrato, así como la necesidad de que el amonio se asimile para que se manifieste la inhibición del transporte de nitrato.

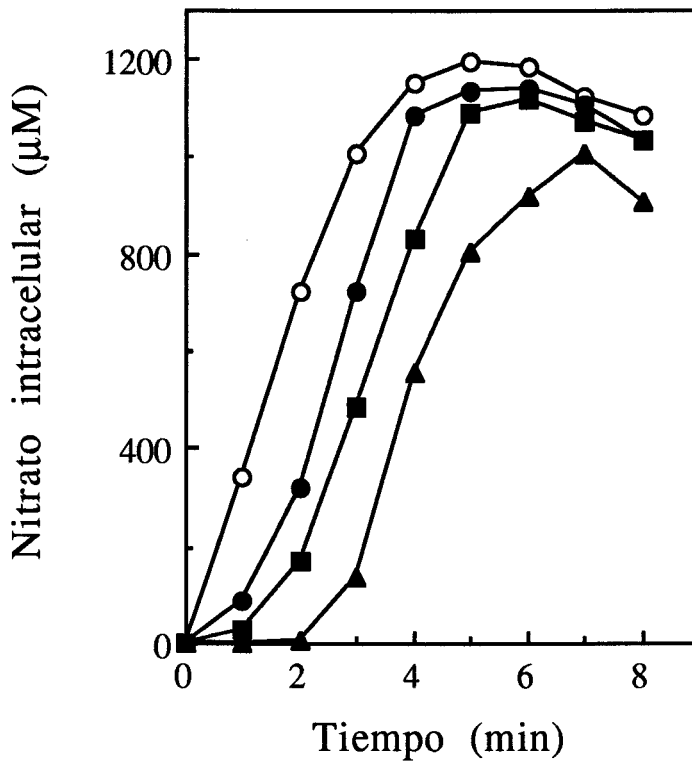
El efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato cesaba al agotarse el amonio añadido, dependiendo su duración de la concentración de amonio añadido al medio de ensayo. Cuando el amonio se añadía al inicio del ensayo se observaba inhibición del transporte de nitrato, incluso a concentraciones tan bajas como 5 μM de NH_4Cl . Este efecto se hacía más marcado a 10 y 20 μM de NH_4Cl . Tras un tiempo variable, tanto mayor cuanto más alta era la concentración inicial de amonio, las células readquirían la capacidad para transportar nitrato, alcanzándose velocidades de transporte muy similares a la del control (Figura 21).

En la Figura 22 se pone de manifiesto la inhibición por amonio del transporte de nitrato en función de su concentración, transcurrido el primer minuto del ensayo. Se ha calculado una $I_{50(\text{amonio})}$ aparente del transporte de nitrato de 4 μM , que refleja la gran eficiencia del amonio como agente inhibitor de dicho transporte.

Estos resultados indican, por una parte, que la estirpe FM6 se comporta de forma semejante a *A. nidulans* frente al amonio, y por otra, que el efecto del amonio es inmediato y reversible, ya que su acción se detecta inmediatamente después de su adición y desaparece al consumirse el amonio, con rápida recuperación de la actividad de transporte de nitrato.

Figura 21

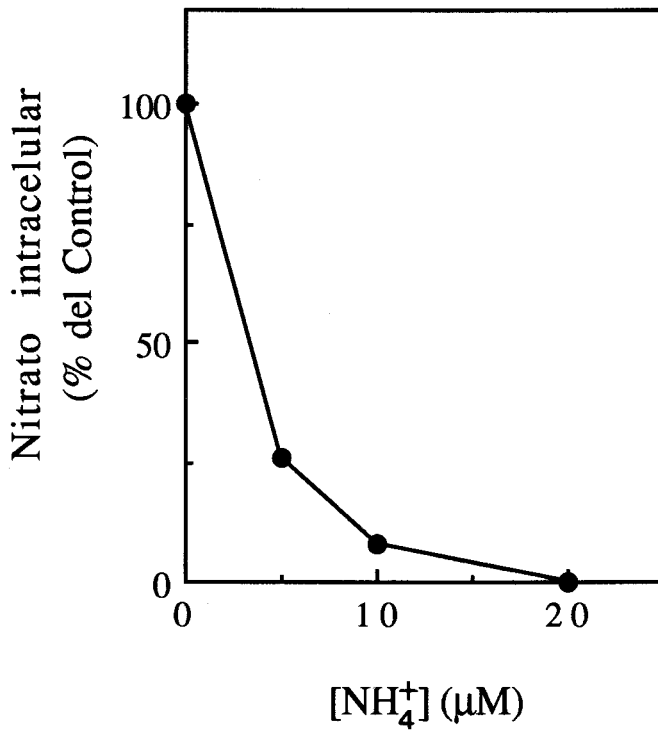
Reversión de la inhibición por amonio del transporte de nitrato en *Anacystis nidulans* R2 FM6



Los ensayos de transporte de nitrato se efectuaron como en la Figura 20, en ausencia de NH_4Cl (\circ) o en presencia de 5 μM NH_4Cl (\bullet); 10 μM NH_4Cl (\blacksquare) y 20 μM NH_4Cl (\blacktriangle), añadido a tiempo cero.

Figura 22

Dependencia de la acumulación intracelular de nitrato con respecto a la concentración de amonio añadido en células de *A. nidulans* R2 FM6



Datos tomados de la Figura 21, representando la acumulación intracelular de nitrato en el primer minuto de ensayo a las distintas concentraciones de amonio añadido. El 100% correspondía a una acumulación intracelular de 340 µM nitrato.

3.2.2. Represión por amonio del transporte de nitrato en *Anacystis nidulans*

En *A. nidulans*, además del efecto negativo del amonio a corto plazo sobre la asimilación de nitrato, descrito anteriormente, existe un efecto a largo plazo que se manifiesta en la represión de la síntesis de los enzimas implicados en la reducción asimilatoria de nitrato (Herrero *et al*, 1985, Herrero y Guerrero, 1986, Guerrero y Lara, 1987). La posibilidad de que el transporte de nitrato esté también sometido a represión nutricional por amonio se ha investigado determinando el transporte de nitrato en la estirpe silvestre *A. nidulans* en oscuridad, en función de la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento.

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, transportaban nitrato en oscuridad. Por el contrario, células cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno eran incapaces de transportar nitrato (Tabla V). Cuando células de *A. nidulans* cultivadas con amonio, incapaces de transportar nitrato, se transfirieron a medios sin fuente de nitrógeno, con KNO_3 , NH_4NO_3 ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a una concentración final de nitrógeno de 5 mM) se observó que tras 5 h en condiciones de cultivo, la actividad de transporte de nitrato se desarrolló en aquellas células transferidas a medios sin amonio (ya fuera a medios sin fuente de nitrógeno o con nitrato) y no se desarrolló en las transferidas a medios con NH_4NO_3 o con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla VI).

Estos resultados indican que en presencia de amonio se reprime el transporte de nitrato, y que este efecto negativo no

Tabla V

Transporte de nitrato en oscuridad en *A. nidulans* en función de la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento de las células

Fuente de nitrógeno	NO ₃ ⁻ intracelular (μM)
KNO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	0

El transporte de nitrato se ensayó en oscuridad, como se describe en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, 10 mM NaHCO₃ y 50 μM KNO₃. Las acumulaciones intracelulares presentadas corresponden a las determinadas transcurridos 6 min de ensayo.

Tabla VI

Desarrollo de la actividad de transporte de nitrato en oscuridad en células de *A. nidulans* cultivadas con amonio y transferidas a medios con diferentes fuentes de nitrógeno

Fuente de nitrógeno		NO ₃ ⁻ intracelular (μM)
Crecimiento	Transferencia	
(NH ₄) ₂ SO ₄	ninguna	124
(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	156
(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	0

Células cultivadas con 7,5 mM (NH₄)₂SO₄ se transfirieron a los medios indicados en la tabla a una concentración final de nitrógeno de 5 mM. Tras 5 h en condiciones de cultivo, se ensayó el transporte de nitrato en oscuridad, en las mismas condiciones que en la tabla V. Los datos corresponden a la acumulación intracelular de nitrato transcurridos 6 min de ensayo.

puede ser neutralizado por la presencia de nitrato en el medio, ya que en presencia de nitrato amónico no se desarrolla la actividad de transporte de nitrato. El nitrato, efectivamente, no se requiere como inductor de la actividad de transporte, desarrollándose también esta actividad al transferir las células a medio sin fuente de nitrógeno.

Por último, la Tabla VII muestra que el desarrollo de la actividad de transporte de nitrato, tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato, no se produce en presencia de cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas, lo cual indica que es necesaria la síntesis "de novo" de proteínas para que se exprese la actividad de transporte de nitrato.

Tabla VII

Efecto del cloranfenicol sobre el desarrollo de la actividad de transporte de nitrato en *A. nidulans* tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato

Fuente de nitrógeno	NO ₃ ⁻ intracelular (μM)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0
KNO ₃	55
KNO ₃ + cloranfenicol	0

Células cultivadas con 7,5 mM (NH₄)₂SO₄ se transfirieron a los medios indicados a una concentración final de nitrógeno de 5 mM y, en su caso, de 50 μg/ml de cloranfenicol. Tras 5 h de incubación en condiciones de cultivo se ensayó el transporte de nitrato en oscuridad en las mismas condiciones que en la tabla V. Los datos corresponden a la acumulación intracelular de nitrato transcurridos 3 min de ensayo.

3.3. CORRELACION ENTRE LA CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE NITRATO Y LA PRESENCIA DE UN POLIPEPTIDO DE 47 kDa EN LA MEMBRANA PLASMATICA DE *A. nidulans*.

Con objeto de determinar la existencia de proteínas de membrana que pudieran estar implicadas en el transporte de nitrato, se ha analizado la composición polipeptídica de la membrana plasmática de *A. nidulans* en diferentes condiciones de cultivo o de incubación en medios con distintas fuentes de nitrógeno, en paralelo a la capacidad de las células para transportar nitrato.

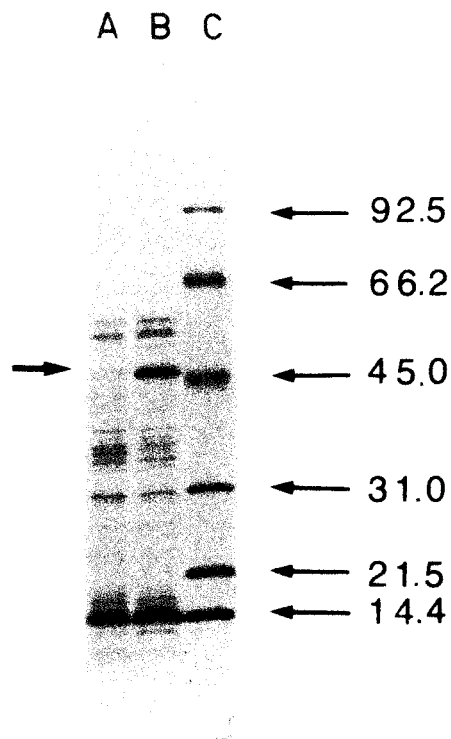
Se obtuvieron preparaciones de membranas plasmáticas de células cultivadas con nitrato o amonio como única fuente de nitrógeno en el medio. El perfil electroforético de los polipéptidos de membrana plasmática en ambos tipos de células, las cultivadas con nitrato capaces de transportar nitrato y las cultivadas con amonio, incapaces de hacerlo (Tabla V), difería especialmente en una banda, que representa el 25% de la proteína total en las preparaciones de membrana plasmática de células cultivadas con nitrato, y que está ausente o en cantidades insignificantes (<2%) en las membranas plasmáticas de células cultivadas con amonio (Figura 23).

Utilizando proteínas patrón de peso molecular conocido se determinó que el peso molecular de dicha banda era de 47000 (Figura 24).

Se han estudiado los cambios en la composición polipeptídica de la membrana plasmática de *A. nidulans* tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medios con KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 (concentración final de nitrógeno de 5 mM), o sin fuente de

Figura 23

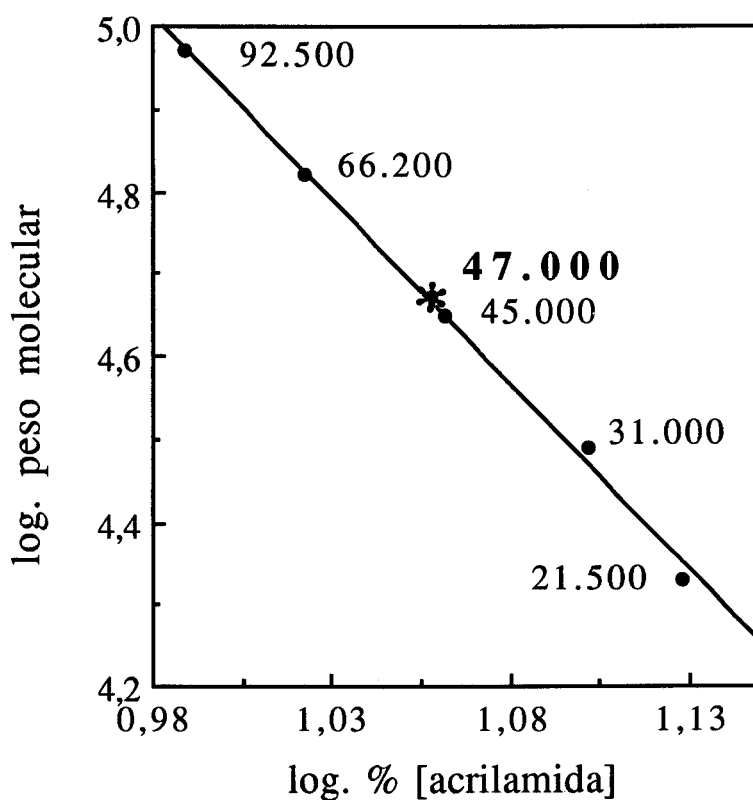
Composición polipeptídica de la membrana plasmática de *A. nidulans*



Perfil polipeptídico de membranas plasmáticas de *A. nidulans* cultivadas en medio con 7,5 mM (NH₄)₂SO₄ (A) o 20 mM KNO₃ (B), como fuente de nitrógeno. (C) patrones de peso molecular utilizados que se indican con las flechas de la derecha. Se prepararon membranas plasmáticas como se indica en la sección 2.2 de Materiales y Métodos. Muestras de estas preparaciones (20 µg de proteína) se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y a tinción con azul de Coomassie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). Los patrones de pesos moleculares utilizados se indican en la sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos. La flecha a la izquierda indica el polipéptido presente en B y prácticamente ausente en A.

Figura 24

Determinación del peso molecular del polipéptido presente en la membrana plasmática de células de *A. nidulans* cuya cantidad varía considerablemente en función de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.



La determinación del peso molecular del péptido señalado en la figura 23 se realizó como se indica en la sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos.

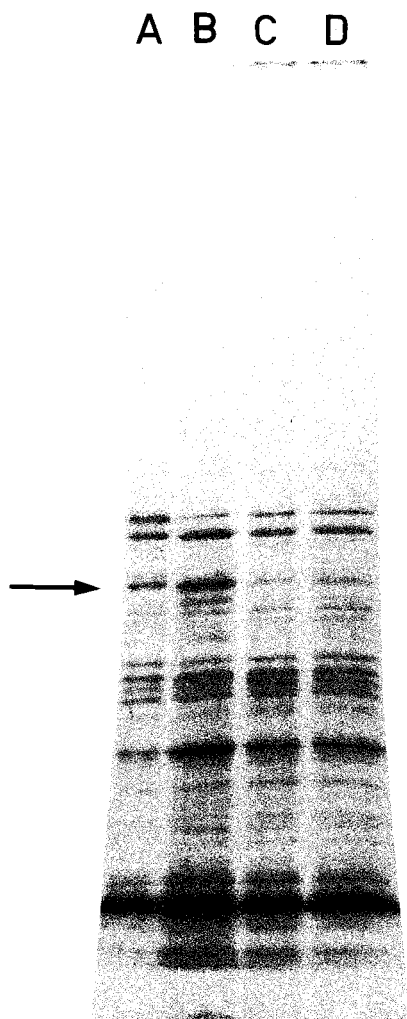
nitrógeno. Como muestra la Figura 25, la banda de 47 kDa sólo aparecía en las preparaciones de membrana plasmática tras la transferencia a medios sin amonio (KNO_3 o sin fuente de nitrógeno), y estaba ausente, o muy disminuída, en células transferidas a medios con amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o NH_4NO_3). Variaciones similares se han observado con respecto a la actividad de transporte de nitrato (Tabla VI). El desarrollo del polipéptido de 47 kDa así como el de la actividad de transporte de nitrato se evitaban si el medio de transferencia contenía cloranfenicol (Figura 26, Tabla VII).

Se ha seguido el desarrollo de la actividad de transporte de nitrato así como del polipéptido de 47 kDa con respecto al tiempo de transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato (Figura 27, Tabla VIII). Tres horas después de la transferencia a nitrato, empezaba a ponerse de manifiesto un aumento en la cantidad de la proteína de 47 kDa, que coincidía con el momento en que las células adquirían la capacidad para transportar nitrato, aumentando progresiva y paralelamente ambos parámetros con respecto al tiempo (Figura 27, Tabla VIII).

Estos resultados demuestran que el nivel del polipéptido de 47 kDa en la membrana plasmática de *A. nidulans* varia de forma paralela a la capacidad de transportar nitrato, en respuesta a la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada por las células. El amonio se comporta como un represor nutricional de la síntesis de este polipéptido y de la capacidad de transportar nitrato, mientras que el nitrato no se requiere como inductor. La correlación encontrada en todas las condiciones entre los niveles de

Figura 25

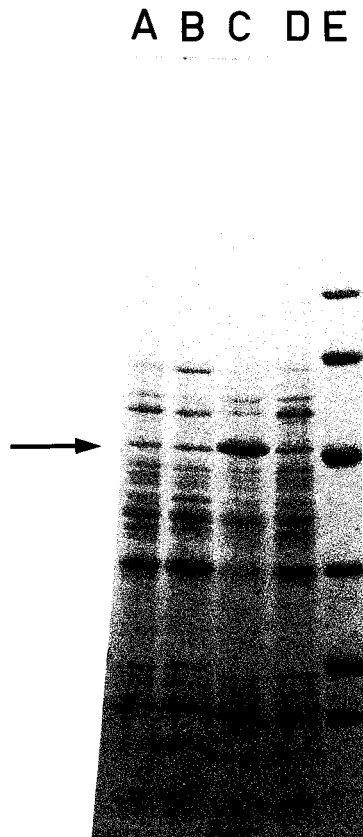
Influencia de la fuente de nitrógeno en la composición polipeptídica de la membrana plasmática de *A. nidulans*



Células cultivadas con 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, se transfirieron a medios que contenían 5 mM KNO_3 (A), ninguna fuente de nitrógeno (B), 5 mM NH_4NO_3 (C), 2,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D). Tras 5 h de incubación en condiciones de cultivo, se analizó la composición polipeptídica de la membrana plasmática de dichas células. Se tomaron muestras conteniendo 30 μg de proteína y se sometieron a electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y a tinción con azul de Coomasie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). La flecha indica el péptido de 47 kDa.

Figura 26

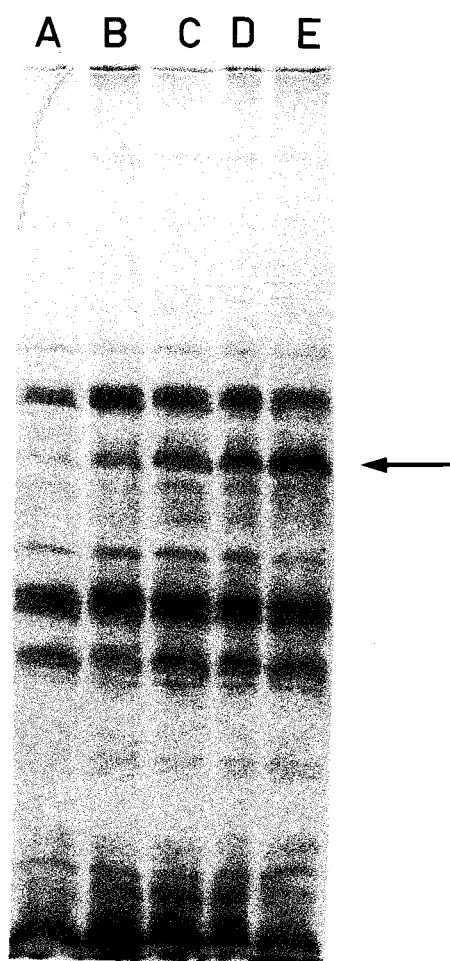
Efecto del cloranfenicol sobre la composición polipeptídica de la membrana plasmática de *A. nidulans* tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato



Células cultivadas en medio con 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A) se transfirieron a medios con 5 mM KNO_3 + 50 $\mu\text{g/ml}$ cloranfenicol (B), 5 mM KNO_3 (C) ó 2,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D) y se mantuvieron 5 h en condiciones de cultivo. Tras dicho tiempo, se obtuvieron preparaciones de membranas plasmáticas como se indica en la sección 2.2 de Materiales y Métodos. Las muestras conteniendo 40 μg de proteína se sometieron a electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y a tinción con azul de Coomasie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). En el carril E se muestran los patrones de peso molecular (sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos). La flecha indica el péptido de 47 kDa.

Figura 27

Evolución con respecto al tiempo de la abundancia del polipéptido de 47 kDa tras la transferencia a medio con nitrato de células de *A. nidulans* cultivadas con amonio



Células cultivadas con amonio (A) se transfirieron a un medio con KNO_3 5 mM durante 1,5 h (B), 3 h (C), 4,5 h (D) y 6 h (E). Transcurridos dichos tiempos se obtuvieron preparaciones de membranas de cada una de ellas (sección 2.2 de Materiales y Métodos) y alícuotas conteniendo 30 (A), 35 (B), 32 (C), 25 (D) y 26 (E) μg de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (10% de acrilamida) y a tinción con azul de Coomasie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). La flecha indica al polipéptido de 47 kDa.

Tabla VIII

Evolución de la capacidad de transporte de nitrato y de la cantidad del polipéptido de membrana de 47 kDa en *A. nidulans*, tras la transferencia a medio con nitrato de células cultivadas con amonio

Tiempo (h)	Nitrato intracelular (μM)	Polipéptido 47 kDa (unidades de área)
0	<2	170
1,5	<2	150
3,0	27	490
4,5	38	570
6,0	76	720
24,0	181	3120

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron a medio con KNO_3 5 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para ensayar el transporte de nitrato (sección 2.3.1 de Materiales y Métodos) y obtener preparaciones de membrana (sección 2.2 de Materiales y Métodos). Las acumulaciones intracelulares presentadas corresponden a las encontradas transcurridos 6 min de ensayo. La cantidad de proteína de 47 kDa se estimó midiendo la absorbancia a 560 nm, tras tinción del gel con azul de Coomassie (sección 2.5.2.2 de Materiales y Métodos), en un densitómetro Desaga CD 60.

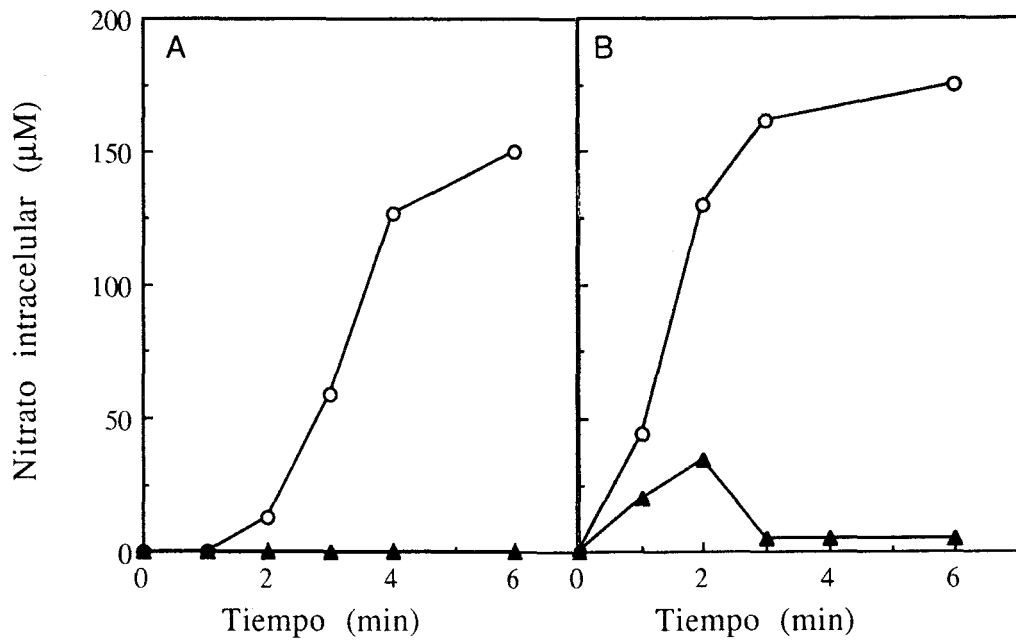
la proteína de 47 kDa y la capacidad de transportar nitrato sugiere que este polipéptido está implicado en el transporte de nitrato en *A. nidulans*.

Simultáneamente al desarrollo de estos estudios, otros autores pusieron también de manifiesto que la estirpe silvestre *A. nidulans* R2 presenta una proteína de 45-48 kDa en su membrana plasmática cuando se cultiva con nitrato como única fuente de nitrógeno, pero no cuando se cultiva con amonio (Madueño et al, 1988b, Omata *et al*, 1989). A partir de *A. nidulans* R2, Omata y col. (1989) han construido la estirpe mutante M45, por inactivación del gen *nrtA* que la codifica. La estirpe M45 carece de la proteína de 45 kDa independientemente de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, contiene niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa similares a la estirpe silvestre y requiere altas concentraciones de nitrato (80 mM) para su crecimiento y para la producción de O₂ dependiente de nitrato. Estos resultados sugieren que la estirpe M45 es deficiente en el transporte de nitrato (Omata *et al*, 1989).

Puesta a nuestra disposición la estirpe M45 por el Dr. T. Omata, se ha estudiado su capacidad de transportar nitrato comparándola con la de la estirpe silvestre (Figura 28). Dado que la estirpe M45 no está afectada en la actividad nitrato reductasa, los ensayos de transporte de nitrato han de realizarse en oscuridad. A una concentración externa de nitrato de 20 μM, la estirpe silvestre acumulaba nitrato hasta un máximo de 150 μM a los 6 min, mientras que la estirpe M45 era incapaz de hacerlo (Figura 28A). Puesto que el fenómeno de inhibición por sustrato del transporte de nitrato no se manifiesta en oscuridad (datos no mostrados) es

Figura 28

Acumulación intracelular de nitrato en células de *A. nidulans* R2 y de la estirpe mutante M45.



El transporte de nitrato se ensayó como se indica en la sección 2.3.1 de Materiales y Métodos, en oscuridad, a 30° C, en tampón Tricina NaOH/KOH, 25 mM, pH 8,3, con 10 mM NaHCO₃ y con una concentración externa de NaNO₃ de 20 µM (A) y 100 µM (B), en la estirpe silvestre (○) y en la mutante M45 (▲).

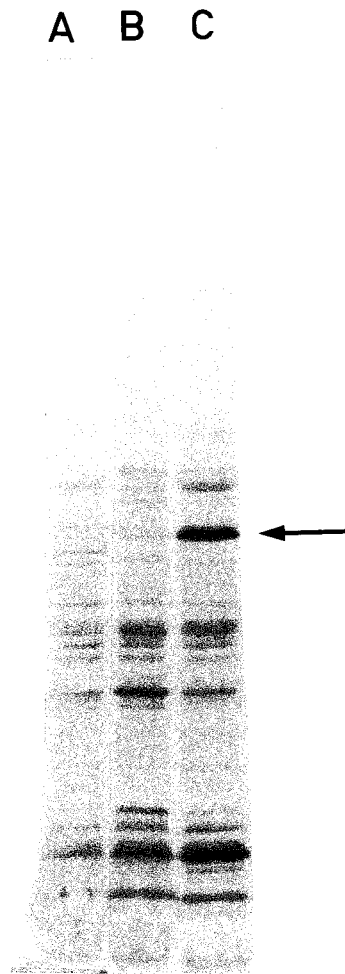
posible ensayar el transporte a concentraciones más altas de nitrato. Para una concentración externa de nitrato de 50 μM se observaron resultados similares a los de la Figura 28A (datos no mostrados). A una concentración más alta de nitrato, 100 μM , la estirpe silvestre acumuló rápidamente nitrato intracelular, y en la estirpe M45 se detectó una pequeña acumulación intracelular de nitrato durante los primeros minutos que se disipaba posteriormente, y que puede atribuirse a la entrada pasiva del ión (Figura 28B).

El análisis electroforético de la membrana plasmática de la estirpe M45 (Figura 29), cultivada con 80 mM KNO_3 como fuente de nitrógeno, mostró que efectivamente, la proteína de 45 kDa estaba ausente en ellas, como ya se había descrito previamente (Omata *et al*, 1989). Es oportuno señalar que esta proteína de 45 kDa presenta esta masa molecular relativa cuando se considera que la del estandar ovoalbúmina es de 43 kDa (Omata *et al*, 1989), sin embargo, si se asigna a la ovoalbúmina una masa molecular de 45 kDa (patrones de peso molecular de BIO-RAD, sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos), resulta para el mismo polipéptido una masa molecular relativa de 47 kDa.

Los resultados indican claramente que la deficiencia específica de esta proteína de 45-47 kDa se corresponde con la carencia de actividad de transporte de nitrato, identificando así a este polipéptido como un componente esencial del sistema de transporte de nitrato en *A. nidulans* R2.

Figura 29

Comparación del perfil electroforético de proteínas de membrana plasmática de *A. nidulans* R2 y de la estirpe mutante M45.



Se obtuvieron preparaciones de membranas plasmáticas (sección 2.2 de Materiales y Métodos) de células de la estirpe M45 cultivadas con 80 mM KNO_3 (A) y de células de *A. nidulans* R2 cultivadas con 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B) ó con 20 mM KNO_3 (C) como fuente de nitrógeno. Muestras conteniendo 60 μg de proteína se analizaron mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida), tiñiéndose el gel con azul de Coomassie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). La flecha indica la proteína de 45 kDa.

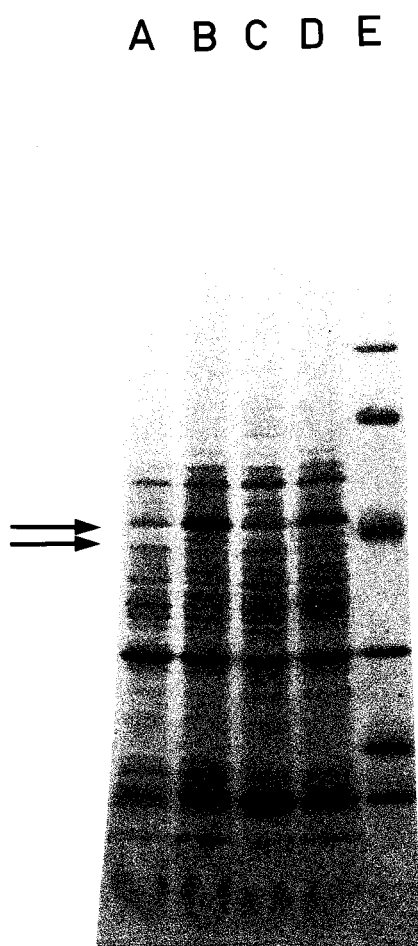
3.4. COMPARACION DEL PERFIL ELECTROFORETICO DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE *A. nidulans* R2 Y LA ESTIRPE FM6

Con objeto de caracterizar mejor a la estirpe FM6 se ha analizado la composición polipeptídica de su membrana plasmática. Dado que esta estirpe es incapaz de crecer con nitrato, se han obtenido preparaciones de membrana plasmática de células cultivadas con amonio, así como de células a las que se les ha inducido la capacidad de transportar nitrato cultivándolas en KNO_2 4 mM durante 18 h (Figura 30). El perfil electroforético de estas membranas es semejante al encontrado en las de células de la estirpe silvestre sometidas a las mismas condiciones. Tanto en la estirpe silvestre como en la mutante, la proteína de 47 kDa aparece sólo en preparaciones de membranas plasmáticas procedentes de células inducidas en nitrito y está prácticamente ausente en las cultivadas con amonio.

Es interesante señalar que otra proteína más minoritaria, que se encuentra inmediatamente por debajo de la de 47 kDa, con un peso molecular de 45 kDa, aparece en la membrana plasmática de células inducidas en nitrito y está ausente en las cultivadas con amonio. Esta segunda banda minoritaria no se observa tan claramente en las membranas de *A. nidulans* R2 cultivada con nitrato (Figura 29), en donde la única diferencia con respecto a las células crecidas en amonio está en la banda de 47 kDa.

Figura 30

Composición polipeptídica de la membrana plasmática de la estirpe FM6. Comparación con su estirpe silvestre



Se obtuvieron preparaciones de membranas plasmáticas (sección 2.2 de Materiales y Métodos) a partir de células de *A. nidulans* R2 cultivadas con 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A) ó inducidas con 4 mM KNO_2 (B) y de la estirpe FM6, cultivada con 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C) ó inducida con 4 mM KNO_2 (D). Muestras conteniendo 40 μg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida), tiñéndose los geles con azul de Coomassie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos). Las flechas indican las proteínas de 47 y 45 kDa. Los patrones de peso molecular (E) se describen en la sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos.

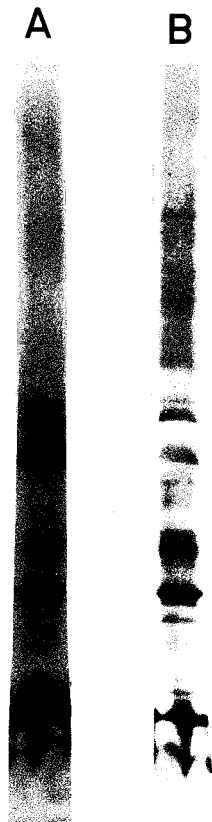
3.5. MARCAJE "IN VITRO" DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE *A. nidulans* CON ^{14}C -PGO

Como se ha descrito anteriormente, el PGO es un inhibidor irreversible del transporte de nitrato en *A. nidulans* (sección 3.1.8.2). Por este motivo se ensayó el efecto "in vitro" del ^{14}C -PGO sobre preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans* crecidas en nitrato.

Tras la incubación de las membranas plasmáticas con ^{14}C -PGO (Figura 32), la práctica totalidad de las proteínas de membrana aparecía marcada con ^{14}C , incluido el polipéptido de 47 kDa implicado en el transporte de nitrato (sección 3.3). La preincubación con nitrato antes y durante el tratamiento con PGO no modificó el patrón de marcaje de los polipéptidos de la membrana plasmática (datos no mostrados). Debido al marcaje indiscriminado obtenido, tanto de proteínas mayoritarias como minoritarias, no es posible adscribir la inhibición del transporte de nitrato por PGO a la unión específica del ^{14}C -PGO a proteínas constituyentes del transportador de nitrato.

Figura 31

Marcaje "in vitro" con ^{14}C -PGO de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans*



Alícuotas conteniendo 80 μg de proteína de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, se incubaron a 37 °C con 5 mM ^{14}C -PGO durante 30 min como se describe en la sección 2.5.3 de Materiales y Métodos. Tras electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y tinción con azul de Coomasie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos), se revelaron las proteínas marcadas por autorradiografía (sección 2.5.2.4 de Materiales y Métodos). (A) Tinción con Coomasie y (B) Autorradiografía del gel.

3.6. FOSFORILACION "IN VITRO" DE PROTEINAS DE MEMBRANA PLASMATICA EN *A. nidulans*

La fosforilación de proteínas juega un papel fundamental en el control del metabolismo bacteriano (Cozzone, 1988, Stock *et al*, 1989, Bourret *et al*, 1991). Este tipo de modificación postraducciona de las proteínas es un mecanismo de regulación que permite a los organismos responder de forma inmediata a cambios ambientales o internos.

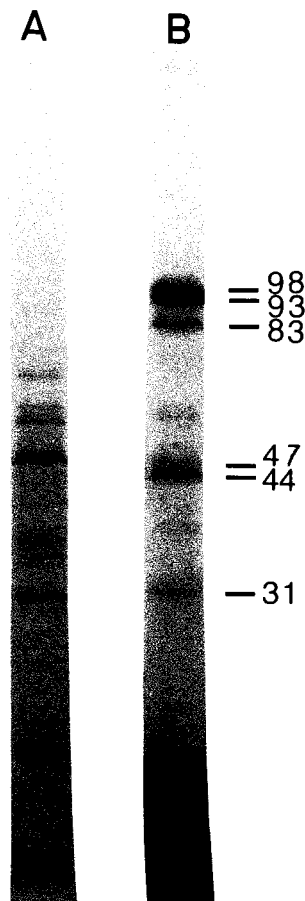
Una aproximación al estudio de la fosforilación de proteínas es ensayar la actividad proteína kinasa en extractos libres de células, utilizando γ - ^{32}P -ATP como sustrato, y analizar el perfil de las fosfoproteínas marcadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y autorradiografía. La adición de metabolitos claves y otros efectores potenciales a los ensayos "in vitro" puede producir estimulación o inhibición de la fosforilación de distintos polipéptidos. Por tanto, los ensayos de actividad kinasa "in vitro" pueden ayudar a reconocer las rutas metabólicas en que la fosforilación de proteínas está implicada como mecanismo regulatorio, e identificar y caracterizar los componentes individuales de estos sistemas. Nosotros hemos estudiado la fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática de *A. nidulans* como paso preliminar para establecer el papel de la fosforilación de proteínas como posible mecanismo regulatorio en este organismo en relación al efecto del amonio, ya que, como se ha descrito anteriormente (sección 3.2.1), la adición de NH_4^+ a células de *A. nidulans* transportando activamente nitrato produce una inhibición casi instantánea de dicho transporte.

Como muestra la Figura 32, tras incubación con γ - ^{32}P -ATP de membranas plasmáticas de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, y separación de las proteínas mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida, se observó por autorradiografía la existencia de una serie de polipéptidos marcados radiactivamente (seis, en la mayoría de los experimentos). Las masas moleculares de las distintas bandas (determinadas como se describe en la sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos) fueron 98, 93, 83, 47, 44 y 31 kDa. Tres de las bandas que aparecían más marcadas, las de 98, 93 y 83 kDa, contenían tan poca proteína que no se visualizaban en la tinción con azul de Coomasie, mientras que el resto sí eran observables tras la tinción con azul de Coomasie. Es interesante resaltar que una de las bandas marcadas radiactivamente coincide con el polipéptido de 47 kDa identificado como componente del sistema de transporte de nitrato (sección 3.3).

Para analizar si el marcaje obtenido era debido a fosforilación o a una unión del ^{32}P -ATP a los polipéptidos, se realizaron ensayos de marcaje con α - ^{32}P -ATP. Si se produjese una unión de la molécula de ^{32}P -ATP a dichas proteínas de la membrana plasmática, el marcaje aparecería utilizando tanto α - como γ - ^{32}P -ATP. La Figura 33 muestra que el marcaje de los polipéptidos sólo se producía cuando las membranas plasmáticas se incubaban con γ - ^{32}P -ATP, no observándose ningún marcaje tras incubar con α - ^{32}P -ATP. Estos datos indican que el marcaje de los polipéptidos se realiza por incorporación del fosfato marcado en la posición γ , es decir, que se produce una fosforilación. Los resultados sugieren que en la preparación de membranas plasmáticas de estas células crecidas en

Figura 32

Marcaje "in vitro" con γ - ^{32}P -ATP de proteínas de membrana plasmática en células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato



Alícuotas de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans*, cultivadas con nitrato, conteniendo 60 μg de proteína, se preincubaron con γ - ^{32}P -ATP como se indica en la sección 2.4.1 de Materiales y Métodos. En (A) se muestra la composición polipeptídica de la membrana tras electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y tinción con azul de Coomassie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos), y en (B), los polipéptidos marcados con ^{32}P tras autorradiografía del gel (sección 2.5.2.4 de Materiales y Métodos). A la derecha se indican las masas moleculares (kDa) de las bandas marcadas radiactivamente, calculadas como se indica en la sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos.

Figura 33

Fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática en células de *A. nidulans*



Autorradiografía de geles de SDS-electroforesis de membrana plasmática de *A. nidulans* incubadas con γ - ^{32}P -ATP (A) o α - ^{32}P -ATP (B). Alícuotas de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans*, cultivadas con nitrato, conteniendo 60 μg de proteína, se preincubaron con γ - ^{32}P -ATP (A) o α - ^{32}P -ATP (B) como se indica en la sección 2.4.1 de Materiales y Métodos. A continuación, se sometieron a electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida), y tras tinción con azul de Coomassie, se revelaron las proteínas marcadas por autorradiografía (secciones 2.5.2.1, 2.5.2.2 y 2.5.2.4 de Materiales y Métodos).

nitrate existe una actividad proteina kinasa capaz de catalizar la fosforilacion especifica de los polipeptidos mencionados.

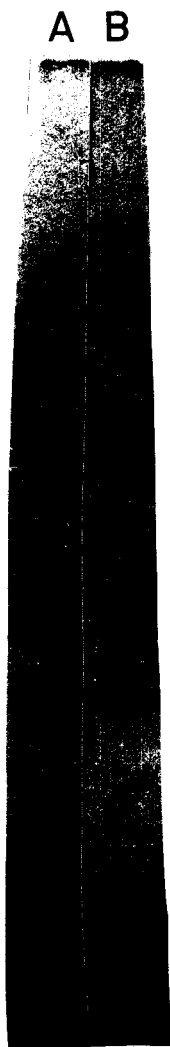
Se ensayo asimismo la fosforilacion de los polipeptidos en preparaciones de membranas plasmaticas hervidas durante 5 min antes de la incubacion con γ - ^{32}P -ATP. Como muestra la Figura 34, las membranas hervidas perdian la capacidad de fosforilar los polipeptidos, sin que se observasen cambios en su perfil polipeptidico tras tincion con azul de Coomasie (datos no mostrados). Estos resultados indican claramente que en la membrana plasmatica de las celulas crecidas con nitrate existe una actividad proteina kinasa termosensible que cataliza especificamente la fosforilacion de estas seis proteinas de la membrana.

La Figura 35, muestra que la actividad proteina kinasa de membrana plasmatica es estrictamente dependiente de Mg^{2+} . Cuando en la mezcla de reaccion se sustituia el MgCl_2 por CaCl_2 a igual concentracion (5 mM) o no se anadian cationes divalentes, no se producia la fosforilacion de las proteinas indicadas anteriormente. En ausencia de cationes divalentes se observaba un fondo radioactivo extendido a lo largo del carril electroforético. En los tres casos el perfil polipeptidico tras tincion con azul de Coomasie era el mismo (datos no mostrados).

Para estudiar el efecto del amonio sobre el patron de fosforilacion de las proteinas de membrana, se obtuvieron preparaciones de membranas de celulas cultivadas con nitrate (en adelante celulas control) y de celulas cultivadas con nitrate que se exponian a la presencia de NH_4Cl 5 mM durante 5 min antes de proceder a la preparacion de membranas plasmaticas (en adelante

Figura 34

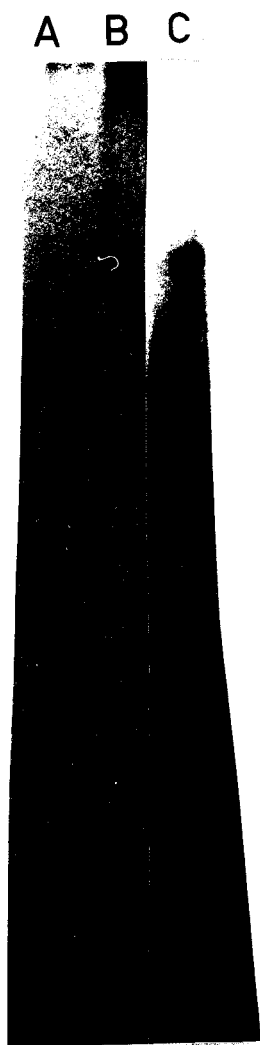
Pérdida de la capacidad de fosforilación "in vitro" en preparaciones de membrana plasmática hervidas de células de *A. nidulans*



Alicuotas de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans*, crecidas en nitrato, conteniendo 60 μg de proteína, sin tratamiento (A) o hervidas durante 5 min a 100 °C (B), se preincubaron con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ como se indica en la sección 2.4.1 de Materiales y Métodos, se sometieron a electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida), a tinción con azul de Coomassie y revelado autorradiográfico (secciones 2.5.2.1, 2.5.2.2 y 2.5.2.4 de Materiales y Métodos). En la figura se muestra la autorradiografía del gel.

Figura 35

Dependencia por Mg^{2+} de la fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática de *A. nidulans*.



Alícuotas con 60 μg de proteína de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, se incubaron con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ como se indica en la sección 2.4.1 de Materiales y Métodos, en presencia de 5 mM MgCl_2 (A), 5 mM CaCl_2 (B) o en ausencia de cationes divalentes (C). Tras electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida) y tinción con azul de Coomassie (secciones 2.5.2.1 y 2.5.2.2 de Materiales y Métodos), se detectaron por autorradiografía los polipéptidos marcados radiactivamente. La figura muestra la autorradiografía del gel.

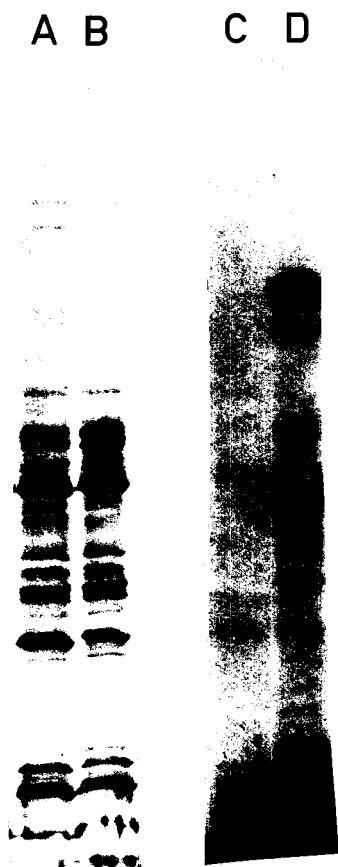
células sometidas a "shock" de amonio). La composición polipeptídica de las membranas plasmáticas de ambos tipos de células era análoga, (Figura 36, A, B) observándose, sin embargo, notables diferencias en el patrón de fosforilación. En la membrana plasmática de las células sometidas a "shock" de amonio no se observaba marcaje, o éste era muy ténue (Figura 36C), en los polipéptidos que aparecían nítidamente marcados en las membranas control (Figura 36D). Esta ausencia de fosforilación "in vitro" de polipéptidos de membrana plasmática en células sometidas a "shock" de amonio sugiere que la actividad proteina kinasa es sensible al "shock" de amonio.

Para obtener más datos sobre este posible sistema de control, se ensayó la actividad fosfatasa alcalina en preparaciones de membrana plasmática y en la fracción soluble de ambos tipos de células. Mientras que en las preparaciones de membrana plasmática la actividad fosfatasa alcalina era prácticamente indetectable (datos no mostrados), sí se detectó actividad fosfatasa alcalina en las fracciones solubles celulares. Como muestra la Tabla IX, en la fracción soluble de células de *A. nidulans* sometidas a "shock" de amonio la actividad fosfatasa alcalina era más del doble de la que presentaba la fracción soluble de las células control no sometidas a "shock".

Estos resultados sugieren que en respuesta al "shock" de amonio se produciría la inactivación de la proteína kinasa, que es funcional en las membranas aisladas de células crecidas en nitrato, y, paralelamente, la activación de una fosfatasa alcalina de la fracción soluble.

Figura 36

Pérdida de la capacidad de fosforilación "in vitro" de proteínas de membrana plasmática de *A. nidulans* tras someter las células a "shock de amonio"



Perfil polipeptídico (A, B) y patrón de fosforilación (C, D) de membranas plasmáticas de *A. nidulans* sometidas a "shock" de amonio (A, C) y de células control (B, D). Alícuotas (60 μg de proteína) de preparaciones de membrana plasmática de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato y sometidas a "shock" de amonio por adición de 5 mM NH_4Cl 5 min antes de obtener la preparación de membrana plasmática (A, C) y de células control, cultivadas con nitrato (B, D), se preincubaron con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ como se indica en la sección 2.4.1 de Materiales y Métodos y se sometieron a electroforesis en SDS-poliacrilamida (7,5-15% acrilamida, sección 2.5.2.1 de Materiales y Métodos). Tras tinción con azul de Coomassie (sección 2.5.2.2) se revelaron los polipéptidos fosforilados mediante autorradiografía.

Tabla IX

Actividad fosfatasa alcalina en la fracción soluble de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato y de las sometidas a "shock"

Fracción soluble celular	Actividad fosfatasa alcalina (mU mg ⁻¹ prot)
Control	1,29±0,05
"shock"	2,90±0,03

La actividad fosfatasa alcalina en la fracción soluble de células control y en la de células sometidas a "shock" de amonio se determinó como se describe en la sección 2.4.2 de Materiales y Métodos. Los datos corresponden a la media aritmética de tres experimentos independientes (\pm la desviación estandar)

En conjunto, los resultados indican que en la membrana plasmática de células de *A. nidulans* crecidas en nitrato existe una actividad proteína kinasa termosensible que es dependiente de Mg^{2+} e independiente de Ca^{2+} que cataliza la fosforilación de algunos polipéptidos de la membrana plasmática, entre ellos al de 47 kDa identificado como componente esencial del transportador de nitrato. Esta actividad proteína kinasa es sensible al "shock" de amonio, y podría estar implicada en el efecto a corto plazo del amonio sobre el transporte de nitrato. Estos resultados inician un nuevo camino para el estudio de la regulación por amonio de la actividad de transporte de nitrato en *A. nidulans*.

4. DISCUSSION

La estirpe mutante *A. nidulans* R2 FM6, carente de actividad nitrato reductasa (Madueño *et al*, 1988a), es capaz de acumular, en condiciones de iluminación, altas concentraciones de nitrato en contra del gradiente electroquímico de este ión (sección 3.1.1). Los valores de acumulación intracelular de nitrato son similares o algo superiores a los encontrados para células de *A. nidulans* tratadas con wolframio, que sintetizan una nitrato reductasa inactiva, ensayadas en iluminación (Lara *et al*, 1987). En la estirpe silvestre *A. nidulans* R2 no se detecta acumulación intracelular de nitrato en estas condiciones, debido a que éste se reduce rápidamente, estableciéndose la situación de equilibrio dinámico entre transporte neto y reducción a concentraciones intracelulares de nitrato muy bajas. En oscuridad, la estirpe silvestre *A. nidulans* R2 y la estirpe FM6 se comportan de forma similar, aunque la velocidad inicial de transporte de nitrato y su acumulación intracelular son mucho más bajas que en condiciones de iluminación. Este comportamiento refleja la limitación de poder reductor y energía a la que están sometidas las células en estas condiciones, y es, por otra parte, similar al observado en células de *A. nidulans* ensayadas en oscuridad (Guerrero *et al*, 1990). A la vista de estos resultados se ha elegido a la estirpe FM6 como sistema más adecuado para estudiar la cinética y bioenergética del transporte de nitrato.

El transporte de nitrato en la estirpe FM6 es fuertemente endergónico, con valores de $\Delta G'$ similares a los descritos para células de *A. nidulans* tratadas con wolframio o ensayadas en oscuridad (Lara *et al*, 1987, Guerrero *et al*, 1990). El transporte de nitrato se afecta notablemente por la temperatura, con un óptimo a 40 °C que

coincide con la temperatura de crecimiento de las células (sección 3.1.2). Se ha calculado un valor de Q_{10} de 3, similar al descrito para el sistema de transporte de nitrato de alta afinidad en raíces de cebada (Glass *et al*, 1990), o el consumo de nitrato en *Chlorella sorokiniana* (Tischner y Lorenzen, 1981). Este valor de Q_{10} es característico de procesos de transporte de solutos mediados por transportadores, en contraste con los mediados por canales iónicos, que muestran baja dependencia por temperatura y valores de Q_{10} entre 1,2 y 1,4 (Serrano 1991).

El transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 presenta un requerimiento estricto por Na^+ (sección 3.1.3). En ausencia de cationes monovalentes añadidos o en presencia de Li^+ o K^+ se detecta una acumulación intracelular de nitrato muy baja. La adición de Na^+ estimula la actividad de transporte de nitrato, siendo la acumulación intracelular de nitrato máxima a concentraciones externas de Na^+ de alrededor de 10 mM. Es oportuno señalar que para concentraciones externas de Na^+ del orden de micromolar, tras una acumulación inicial de nitrato, se observa una salida rápida del ión siguiendo su gradiente electroquímico. Esta salida sugiere una fuerte limitación en la fuente de energía para la entrada activa de nitrato. Además, el transporte de nitrato es sensible a monensina, un ionóforo que relaja el gradiente electroquímico de Na^+ (Skulachev, 1985, Riddell *et al*, 1988, Russell *et al*, 1988, Brown *et al*, 1990). El transporte de nitrato depende, por tanto, del mantenimiento del gradiente electroquímico de sodio a través de la membrana

plasmática, gradiente que podría representar la fuente inmediata de energía para el transporte.

En condiciones de iluminación y a concentraciones saturantes de sodio, el transporte de nitrato muestra una cinética compleja de saturación por nitrato, con una inhibición aparente por sustrato para concentraciones de nitrato superiores a 25 μM (Figura 10). La $K_{s(\text{nitrato})}$ aparente calculada en este trabajo para el transporte de nitrato (1 μM) es similar a la determinada por Omata y col. (1989) para la producción de O_2 dependiente de nitrato en células de *A. nidulans* R2 en presencia de inhibidores de la asimilación de amonio y CO_2 (MSX y DLG) y menor que la determinada por Tischner y Schmidt (1984; 3,9 μM) para el consumo de nitrato en células de *A. nidulans*.

Otros autores han observado inhibición por sustrato del consumo de nitrato en *A. nidulans* (Tischner y Schmidt, 1984) y *Chorella sorokiniana* (Tischner y Lorenzen, 1981), y han sugerido que la inhibición podría ocurrir al unirse una segunda molécula de nitrato al transportador, transformándolo en un complejo inactivo. Sin embargo, el requerimiento por Na^+ del transporte de nitrato observado en este trabajo permitiría explicar la inhibición por sustrato del transporte de nitrato en términos de un simporte $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$. Algunos enzimas y transportadores bisustrato muestran inhibición aparente por sustrato con respecto a uno o a ambos sustratos, dependiendo del mecanismo de reacción (Segel, 1975, Cleland, 1979). Este fenómeno es relativamente frecuente en sistemas en los que intervienen iones metálicos, habiéndose desarrollado diferentes modelos cinéticos para explicar tales

comportamientos (London y Steck, 1969, Segel 1975, Morrison 1979).

Para determinar el mecanismo de reacción del transporte de nitrato es necesario analizar la respuesta del sistema a la concentración de nitrato para diferentes concentraciones fijas de Na^+ , y viceversa (sección 3.1.4). Este estudio ha permitido determinar que la curva de velocidad de transporte de nitrato respecto a la concentración externa del mismo muestra un pico de velocidad que se desplaza hacia concentraciones superiores de nitrato a medida que aumenta la concentración de sodio. Por otra parte, el perfil de velocidad de transporte de nitrato respecto a la concentración externa de sodio muestra cinéticas complejas de saturación por Na^+ , que varían desde una hipérbola, a bajas concentraciones de nitrato, a una curva bifásica, al aumentar la concentración de nitrato, sin que en ningún caso se observe inhibición por exceso de sodio. Este comportamiento tiene el mejor ajuste con un caso particular del modelo cinético propuesto por London y Steck (1969) para enzimas bisustrato, en el que interaccionan el sustrato y un ión metálico activador de la catálisis. De acuerdo con tal modelo cinético, el verdadero sustrato para el transporte sería el NaNO_3 , actuando el ión Na^+ , además, como un activador no esencial para el transporte (London y Steck, 1969, Segel, 1975). El modelo asume dos formas del transportador: una forma no activada y otra activada por la unión del Na^+ . Ambas formas serían activas en el transporte, de ahí que el sodio sea un activador no esencial, aunque la constante de velocidad sería más

alta para la forma activada del transportador. El mecanismo de reacción que se propone se muestra en el Esquema 3.

Este mecanismo (Segel, 1975) permite explicar el comportamiento cinético del transporte de nitrato. Así, la curva de velocidad de transporte frente a concentración de nitrato mostraría un pico de velocidad porque al aumentar la concentración de nitrato aumentaría la concentración de NaNO_3 pero también disminuiría la concentración de Na^+ libre, disponible para el sitio activador, lo que se traduciría en menor velocidad inicial. Cuando $[\text{NO}_3^-] \gg [\text{Na}^+]$, virtualmente todo el Na^+ estaría formando parte del complejo NaNO_3 , encontrándose el transportador mayoritariamente en su forma no activada. La curva de velocidad de transporte frente a concentración de sodio, a baja concentración de nitrato mostraría un perfil cóncavo, ya que, aún existiendo gran cantidad de Na^+ , se tendría poco complejo NaNO_3 , produciéndose una saturación aparente del transporte de nitrato a baja concentración de sodio que en realidad refleja la limitación por nitrato. Al aumentar la concentración de nitrato, la curva, inicialmente cóncava a baja concentración de Na^+ , se haría sigmoideal para concentraciones más altas de sodio, produciéndose un aumento en la velocidad de transporte de nitrato al aumentar la proporción de transportador activado.

El valor de $K_{s(\text{nitrato})}$ aparente estimado para el transporte de nitrato ($1 \mu\text{M}$) (Figura 10) sería aún menor si se calcula, no para el ión libre, sino para el nitrato sódico. Teniendo en cuenta la constante de disociación del NaNO_3 y estimando la concentración del sustrato

NaNO_3 para las concentraciones totales de Na^+ y NO_3^- existentes en cada caso, resultaría una $K_s(\text{NaNO}_3)$ menor de $0,2 \mu\text{M}$.

La operación de un simporte sodio/nitrato suministra una base física para el acoplamiento entre el gradiente electroquímico de sodio y el transporte de nitrato. Una cuestión importante es el origen de este gradiente. En la literatura acerca de la bioenergética cianobacteriana se ha descrito una extrusión activa de H^+ y Na^+ a través de la membrana plasmática, pero existen discrepancias en cuanto al papel que juegan estos sistemas en el circuito de iones.

Un grupo de autores sostiene la existencia de un circuito quimiosmótico basado en H^+ , similar al que existe en plantas, en el que el $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ se formaría por el funcionamiento de una H^+ -ATPasa y/o por una cadena redox translocadora de H^+ . La energía del $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ podría utilizarse para generar un $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ mediante una antiporte Na^+/H^+ que introdujera H^+ al interior celular a favor de su gradiente electroquímico, expulsando Na^+ en contra de su gradiente (Paschinger, 1977, Nitschman *et al*, 1982, Blumbald *et al*, 1984, Scherer *et al*, 1984, Molitor y Peschek, 1985). Esta situación sería viable para cianobacterias a $\text{pH} \leq 7$.

Otros autores han sugerido un circuito quimiosmótico basado en Na^+ , similar al que existe en células animales y algunas bacterias, en el cual se produciría una extrusión activa de Na^+ a través de bombas primarias de Na^+ dependientes de ATP o luz (Batterton y van Baalen, 1971, Brown *et al*, 1990). En este caso el sentido del antiporte Na^+/H^+ sería opuesto al descrito anteriormente y el $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ se formaría a expensas del $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ (Ritchie, 1992a). Esta situación existiría en cianobacterias crecidas a pH alcalinos. A favor de esta

propuesta, está el hecho de que las cianobacterias crecen a pH alcalinos (Allen, 1968, Wolk, 1973, Miller *et al*, 1984) y mantienen su pH citoplásmico prácticamente constante independientemente del pH extracelular. Para un pH externo de 8,0-8,5, el pH citoplásmico es de 7,5 y el $\Delta\tilde{\mu}H^+$ está próximo a cero (Falkner *et al*, 1976, Peschek *et al*, 1985, Ritchie, 1991, 1992a). Además, incluso las cianobacterias de agua dulce crecen a concentraciones milimolares de sodio en el medio (Allen, 1968, Miller *et al*, 1984) y mantienen la concentración intracelular de Na^+ mucho más baja que la externa, expulsando activamente Na^+ y acumulando K^+ , para equilibrar la carga eléctrica que se descompensa por la salida de Na^+ (Dewar y Barber, 1973, Paschinger, 1977, Ritchie 1991, 1992a). El $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ en condiciones fisiológicas es de alrededor de -10 kJ mol^{-1} (Ritchie, 1992a). Es difícil pensar en términos termodinámicos que un $\Delta\tilde{\mu}H^+$ de aproximadamente cero pueda generar tal $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ y sería más lógico que ocurriese lo contrario. Así, el $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ formado por una bomba primaria podría servir para crear un $\Delta\tilde{\mu}H^+$ mediante el antiporte Na^+/H^+ . De esta forma se regularía el pH intracelular, y el $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ podría utilizarse como fuente de energía para el transporte secundario de nutrientes dependiente de Na^+ (Miller *et al*, 1984, Ritchie, 1992a, Lara *et al*, 1993).

El hecho de que el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 no sólo no se inhiba, sino que incluso se estimule, por amiloride (Figura 9), un conocido inhibidor de antiportes Na^+/H^+ (Moolenaar *et al*, 1984, Kleyman y Cragoe, 1990) apoya la idea de que el $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ requerido para el transporte de nitrato no se forma a expensas del

antiporte Na^+/H^+ . La inhibición de éste incluso permitiría disponer al transporte de nitrato de más energía para su funcionamiento.

En la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*, el consumo de nitrato y la entrada de otros solutos, tales como urea y aminoácidos son dependientes de Na^+ (Rees *et al*, 1980, Syrett, 1988). También se ha descrito transporte de nutrientes dependientes de Na^+ en la diatomea *Cyclotella* (Hellebust, 1978). Como se ha indicado en la Introducción de este trabajo (pag. 7), en algas eucarióticas y plantas, el transporte de nitrato es dependiente de H^+ , de acuerdo con el mecanismo general de cotransporte $\text{H}^+/\text{anión}$ que opera en la mayoría de estos organismos.

En cianobacterias, se han descrito otros transportes de aniones dependientes de Na^+ , tales como el transporte activo de bicarbonato, que requiere concentraciones milimolares de Na^+ (Kaplan *et al*, 1984, Espie *et al*, 1988, Miller *et al* 1990), y el transporte de cloruro (Reed *et al*, 1985, Ritchie, 1992b). En consonancia con estos datos, estudios "in vivo" con NMR del transporte de sodio en *A. nidulans*, han puesto de manifiesto una entrada de Na^+ dependiente de nitrato, nitrito, cloruro o bromuro (Nitschman y Packer, 1992). También se ha descrito la dependencia por Na^+ del consumo de nitrato y de fosfato (García-González *et al*, 1987, Fernández-Valiente y Avedaño, 1993).

La dependencia por sodio del transporte de aniones explicaría la esencialidad del Na^+ para el crecimiento de las cianobacterias a pH alcalino (Allen, 1952, Kratz y Myers, 1955, Allen y Arnon, 1955, Brownell y Nicholas, 1967, Baatteron y Van Baalen, 1968, Miller *et al*, 1984, Fernandez Valiente *et al*, 1984; Kaplan *et al*, 1984, Espie *et*

al., 1988; Miller *et al* 1990), y refuerza la importancia de la energética del Na⁺ en cianobacterias (Skulachev, 1985, Brown *et al* 1990).

Syrett (1988) ha sugerido que en microalgas marinas que viven a pH alrededor de 8, es el $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ más que el $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$, la fuente de energía para el transporte de nutrientes. Muchas de las evidencias ya descritas permitirían extender esta hipótesis a algas alcalófilas o alcalotolerantes, entre ellas las cianobacterias (Lara *et al.*, 1993). A los pH alcalinos a los que viven estos organismos, la creación y el mantenimiento de un $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ a través de la membrana plasmática supondría un coste energético inmenso para la economía celular. Este problema se obviaría utilizando el $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ que le suministra su entorno natural, haciéndolos más competitivos con respecto a otros organismos en sus nichos ecológicos.

Los resultados descritos en la sección 3.1.5 muestran que el nitrito inhibe competitivamente el transporte de nitrato, con cinéticas que son típicas de inhibición competitiva por sustratos alternativos (Segel, 1975) y apoyan la idea de que nitrato y nitrito comparten un mismo sistema de transporte. Esto concuerda con la inhibición competitiva por nitrato del consumo de nitrito descrito para *A. nidulans* (Madueño *et al.*, 1987), *Phaeodactylum tricornutum* (Bilbao *et al.*, 1981) y *Cyanidium caldarium* (Fuggi, 1989), y con la inhibición competitiva por nitrito de la entrada de nitrato en raíces de cebada (Siddiqi *et al.*, 1992). Un mutante de transporte de nitrato de la bacteria *Azotobacter chroococcum* también es deficiente en el

consumo de nitrito, por lo que se ha propuesto que nitrato y nitrito comparten el mismo sistema de transporte (Ruiz et al, 1992).

No obstante, se ha hipotetizado la existencia de dos sistemas de transporte diferentes para nitrato y nitrito en base a una inhibición de tipo mixto por nitrato del consumo de nitrito en *Chlamydomonas* (Córdoba et al, 1986) y también en base a diferencias en cuanto al efecto de luz monocromática sobre el consumo de nitrato y nitrito en *Chlorella* (Calero et al, 1980). En *Neurospora*, el nitrito se comporta como un inhibidor no competitivo del consumo de nitrato (Schloemer y Garret, 1974a) y el nitrato no inhibe el consumo de nitrito (Schloemer y Garret, 1974b), lo que es consistente también con la existencia de dos sistemas independientes. Parece pues, que la operación de un sistema común o dos sistemas distintos para el transporte de nitrato y nitrito varía con la especie, sin que se pueda perfilar una pauta filogenética.

Con respecto a posibles competidores con el Na^+ , el K^+ muestra un efecto inhibitorio sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6, aunque sólo a concentraciones de sodio superiores a 500 μM (sección 3.1.6). Cuando no se añade sodio al medio, o su concentración es muy baja, se produce una ligera estimulación. Parece lógico pensar que a bajas concentraciones de Na^+ , el K^+ podría sustituir al Na^+ quizás en el sitio activador. Sin embargo, a altas concentraciones de Na^+ , la presencia de concentraciones altas de K^+ extracelular dificultaría la entrada de nitrato y sodio, quizás por alterar el equilibrio eléctrico de la membrana.

Por otra parte, los resultados descritos en la sección 3.1.7 muestran que el clorato no tiene ningún efecto negativo sobre el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6, incluso cuando la concentración de clorato es 500 veces superior a la de nitrato, observándose, en algunos casos, una ligera estimulación en la acumulación intracelular de nitrato. Estos resultados indican que en *A. nidulans* clorato y nitrato no compiten por el mismo sistema de transporte.

El clorato es reducido a clorito por la nitrato reductasa y este compuesto es extremadamente tóxico para los organismos (Åberg, 1947, Solomonson y Vennesland, 1972, Nakagawa y Yamashita, 1986, LaBrie *et al*, 1991). La toxicidad del clorato se ha utilizado habitualmente como una herramienta para obtener dos tipos de mutantes diferentes en la asimilación de nitrato, seleccionando la resistencia a clorato (Oostindier-Braaksma y Feenestra, 1973, Cove, 1976, Klittich y Leslie, 1989, Ruiz *et al*, 1990): mutantes deficientes en transporte de nitrato y mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa. Aunque por este procedimiento se han obtenido una gran variedad de mutantes deficientes en actividad nitrato reductasa en una amplia gama de organismos, sólo se han descrito mutantes deficientes en transporte de nitrato en la bacteria *Azotobacter chroococcum* (Ruiz *et al*, 1990), en el hongo *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al*, 1991) y en la planta superior *Arabidopsis thaliana* (Tsay *et al*, 1993). El hecho de que clorato y nitrato no compartieran el mismo sistema de transporte en cianobacterias explicaría la dificultad de obtener mutantes deficientes en transporte seleccionando resistencia a clorato.

En la literatura se ha propuesto que clorato y nitrato podrían compartir el mismo sistema de transporte en base a la inhibición por nitrato de la entrada de clorato en células de *Chara coralina* (Deane-Drumond, 1984), y en raíces de cebada y maiz (Deane-Drumond y Glass, 1982, Mc Clure *et al*, 1986). No obstante, en estos estudios no hay datos sobre el efecto del clorato en el consumo o el transporte de nitrato. Doddema y Telkamp (1979) observaron también, en *Arabidopsis thaliana*, que el consumo de clorato se inhibía en presencia de nitrato, indicando efectos competitivos entre ambos. Sin embargo, el consumo de nitrato se estimulaba en presencia de bajas concentraciones de clorato. Siddiqi *et al* (1992) han obtenido resultados más consistentes en raíces de cebada, donde el clorato a concentraciones menores de 1 mM no tiene efecto sobre el sistema de transporte de nitrato de alta afinidad. A concentraciones superiores de clorato (5 mM) se inhibe de forma no competitiva el transporte de nitrato, con un valor de K_i muy alto, que indica su baja afinidad por clorato. Estos autores han observado también que el clorito, compuesto que se forma tras la reducción de clorato, sí es un potente inhibidor del transporte de nitrato. Estos resultados sugieren que en raíces de cebada el clorito, y no el clorato, podría competir con el nitrato por su sistema de transporte. También, se ha descrito que, en *Cyanidium caldarium* y *Paracoccus denitrificans*, no existe consumo de clorato (Fuggi *et al*, 1981, John, 1977). La competencia a nivel de transporte entre nitrato y clorato debe ser, pues, reconsiderada.

El ONB, un análogo estructural del nitrato, ha resultado ser un inhibidor efectivo y reversible del consumo de nitrato en *A. nidulans* (sección 3.1.8.1). Estos datos están de acuerdo con los de Tischner y Lorenzen (1981) que han descrito inhibición competitiva por ONB del consumo de nitrato en el alga verde *Chlorella sorokiniana*. La inhibición por ONB se efectúa a nivel del transporte de nitrato al interior celular, con una cinética característica de inhibidores que actúan como sustratos alternativos. Por el contrario, el PGO, un reactivo que se une covalente e irreversiblemente a residuos de arginina, se comporta como inhibidor irreversible del transporte de nitrato (sección 3.1.8.2). Resultados similares se han descrito para el consumo de nitrato en raíces de maíz y cebada (Dhugga *et al*, 1988, McClure *et al*, 1990b, Glass *et al*, 1990). Estos datos sugieren que hay residuos de arginina esenciales para el transporte de nitrato, bien en el propio transportador o en algún otro complejo proteico de la membrana plasmática implicado indirectamente en el proceso. Aún así, no ha sido posible identificar tales complejos, ya que el tratamiento "in vitro" con ^{14}C -PGO de preparaciones de membranas plasmáticas de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato produce un marcaje inespecífico de la mayoría de las proteínas de la membrana (sección 3.5), no pudiéndose por tanto, correlacionar la pérdida de actividad de transporte de nitrato con la unión específica del ^{14}C -PGO a determinados polipéptidos de la membrana plasmática que pudieran estar implicados en dicho transporte.

En cuanto a la regulación del sistema de transporte de nitrato, los resultados que se presentan en la sección 3.2.1 muestran que en la estirpe mutante FM6, el amonio inhibe de forma drástica y efectiva el transporte de nitrato. Esta inhibición no está producida por el ión amonio en sí, sino que depende de su asimilación, ya que se previene por tratamiento de las células con MSX. Estos resultados indican que el transporte de nitrato en la estirpe FM6 se comporta frente al amonio de igual forma que en la silvestre *A. nidulans* (Lara *et al*, 1987), hecho de gran importancia a la hora de elegir dicha estirpe como el sistema más adecuado para la caracterización bioquímica del transporte de nitrato. El transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 es enormemente sensible a amonio lo que se hace patente en el valor de $I_{50(\text{amonio})}$ aparente que se calcula para el proceso (4 μM). Además, el efecto del amonio sobre el transporte de nitrato es reversible, y la actividad de transporte se recupera rápidamente al agotarse el amonio del medio, como estaba descrito para el consumo de nitrato en *A. nidulans* (Flores *et al*, 1980).

La expresión del sistema de transporte de nitrato depende de la naturaleza de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (sección 3.2.2). Mientras que células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato poseen capacidad para transportar nitrato, las cultivadas con amonio se muestran incapaces de hacerlo (Lara *et al*, 1987, Sivak *et al*, 1989). La actividad de transporte de nitrato se induce tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medio con nitrato o sin fuente de nitrógeno, y no al transferirlas a medios con amonio o nitrato amónico. El desarrollo de esta capacidad se previene por tratamiento con cloranfenicol. Estos resultados

indican que el amonio previene la síntesis del transportador de nitrato y que el nitrato no se requiere como inductor. Este patrón de regulación es semejante al de nitrato reductasa (Herrero *et al*, 1985) y nitrito reductasa (Herrero y Guerrero, 1986), enzimas implicados en la reducción de nitrato, sugiriendo que la síntesis del transportador de nitrato y de los enzimas implicados en su reducción están sometidos al mismo tipo de control por nitrógeno.

Se ha detectado en la membrana plasmática de *A. nidulans* un polipéptido de 47 kDa cuyos niveles varían en función de la naturaleza de la fuente de nitrógeno presente en el medio de crecimiento (Apartado 3.3). Mientras que en células cultivadas con nitrato esta proteína es muy abundante, en las cultivadas con amonio está ausente o en cantidades insignificantes. Tras la transferencia de células cultivadas con amonio a medios con nitrato o sin fuente de nitrógeno, se produce el desarrollo de la proteína de 47 kDa en paralelo con la actividad de transporte de nitrato. El íntimo paralelismo entre presencia o ausencia de la proteína de 47 kDa y la existencia o no de transporte, sugiere que el polipéptido de 47 kDa está implicado en el transporte de nitrato.

Otros autores han descrito también la existencia de un polipéptido de 45-48 kDa que aparece en la membrana plasmática de células de *A. nidulans* R2 cultivadas con nitrato pero no en las cultivadas con amonio (Madueño *et al*, 1988b, Omata *et al*, 1989). Omata y colaboradores (1989) han construido mediante ingeniería genética un mutante de *A. nidulans* R2, la estirpe M45, que carece de esta proteína de 45 kDa, independientemente de la fuente de nitrógeno en la que se cultive. Este mutante, teniendo niveles de

actividades nitrato y nitrito reductasa similares a los de la estirpe silvestre, requiere altas concentraciones de nitrato para su crecimiento y para la producción de O₂ dependiente de nitrato. Por estas características se ha sugerido que es un mutante deficiente en el transporte de nitrato (Omata *et al*, 1989). Nuestros resultados muestran que, efectivamente, la estirpe M45 es incapaz de transportar nitrato en contraste con la estirpe silvestre que sí es capaz de hacerlo en las mismas condiciones. El hecho de que la carencia específica de la proteína de 45 kDa en la estirpe M45 traiga consigo, una vez más, la pérdida de la actividad de transporte indica que esta proteína es un componente esencial del transportador de nitrato en *Anacystis nidulans*.

El gen que codifica la proteína de 45 kDa (*nrt A*) se ha clonado y secuenciado (Omata, 1991). Su secuencia no presenta homología con los genes *nar X* (sensor de nitrato, Nohno *et al*, 1989) y *nar K* (antiporte nitrato/nitrito, Noji *et al*, 1989) de *Escherichia coli* implicados en la respiración de nitrato (Omata, 1991), ni con el del transportador de nitrato de *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al*, 1991). El análisis hidropático de la secuencia de aminoácidos deducida del gen muestra la existencia de dos regiones hidrofóbicas que pueden atravesar la membrana plasmática (Omata, 1991). La proteína de 45 kDa, por tanto, es improbable que constituya por sí misma el transportador de nitrato a menos que formase un homopolímero, pudiendo pues existir otras proteínas implicadas. En este sentido, en *A. nidulans* R2 se ha descrito la existencia de una agrupación de genes que se cotranscriben juntos *nirA-nrtA-nrtB-nrtC-nrtD-narB* implicados en la asimilación de nitrato (Luque *et al*,

1992, Omata *et al*, 1993). El gen *nirA* codifica para la nitrito reductasa (Omata, 1991, Luque *et al*, 1993). El gen *nrtA* codifica la proteína de 45 kDa (Omata *et al*, 1989). El gen *narB* codifica para la nitrato reductasa (Andriesse *et al*, 1990). La región *nrtB-nrtD* se ha secuenciado, y se han construido mutantes específicos afectados en cada uno de estos genes. Por las características de estos mutantes y por la homología de estos genes con los de otros sistemas de transporte bacterianos, tales como el transporte de sulfato de *A. nidulans* y el de la glicina-betaina de *Escherichia coli*, se ha propuesto que sus productos constituyen en conjunto el transportador de nitrato (Omata *et al*, 1993). La cotranscripción de esta agrupación de genes se reprime en presencia de amonio (Suzuki *et al*, 1992). También se ha identificado un gen regulador (*ntcA*), con efecto pleiotrópico positivo sobre la expresión de genes sometidos a control por amonio (Vega-Palas *et al*, 1990, 1992).

Sólo en dos organismos, *Arabidopsis thaliana* (Tsay *et al*, 1993) y *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al*, 1991), se ha identificado un gen que codifica para un transportador de nitrato, aunque no se ha encontrado homología entre ambos.

El mecanismo por el cual, en condiciones de asimilación de amonio, se inhibe la actividad y se reprime la expresión del sistema de transporte de nitrato es aún una incognita. Estudios previos en nuestro laboratorio habían permitido descartar la hipótesis de que los niveles intracelulares de aminoácidos, y en particular de glutamina, pudiesen estar implicados como señales reguladoras en el control de la actividad o la síntesis del sistema (Coronil y Lara, 1991,

Coronil, 1992), obligando a investigar en otra dirección. En *Anacystis nidulans* se ha puesto de manifiesto la existencia de una proteína soluble de 13 kDa que presenta homología con la proteína P_{II} de enterobacterias (Tsinoremas et al, 1991, Allen, 1992). En *E. coli*, esta proteína está implicada en la transducción de señales que regulan la asimilación de nitrógeno, a nivel transcripcional y postraduccional. En *Anacystis*, "in vivo", dicha proteína se encuentra muy fosforilada cuando a las células se iluminan con luz del fotosistema II y poco fosforilada con luz del fotosistema I, defosforilándose en cualquier caso, cuando se añade amonio al medio de cultivo. Los resultados sugieren que la cadena fotosintética de electrones puede regular la asimilación de nitrógeno en cianobacterias por medio de una modificación covalente postraduccional de la proteína P_{II}, y que el amonio puede desencadenar una cascada de transducción de señales en relación al metabolismo del nitrógeno en la que podría estar implicada la defosforilación de la proteína P_{II} (Tsinoremas et al, 1991, Allen, 1992).

Los resultados presentados en la sección 3.6 muestran que en la membrana plasmática de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato existe una actividad proteína kinasa dependiente de Mg²⁺, que cataliza la fosforilación "in vitro" de distintos polipéptidos de la membrana plasmática, incluido el de 47 kDa identificado como componente esencial del transportador de nitrato. Esta actividad proteína kinasa de la membrana plasmática es sensible al "shock" de amonio, producido "in vivo", perdiéndose tras él, la capacidad de fosforilar polipéptidos de la membrana plasmática. Estos datos indican que el "shock" de amonio podría provocar la inactivación de

la proteína kinasa de la membrana plasmática y, al mismo tiempo, la activación de una fosfatasa alcalina de la fracción soluble.

En cianobacterias, se han propuesto también otros procesos que puedan estar regulados por fosforilación de proteínas, como el transporte de carbono inorgánico (Bloye *et al*, 1992), la adaptación de crecimiento autotrófico a crecimiento heterotrófico (Mann *et al*, 1991), y la distribución de la energía de excitación entre los dos fotosistemas en respuesta a la calidad de luz incidente (Allen *et al*, 1985, Sanders *et al*, 1989).

Nuestros resultados sugieren que la inhibición del transporte de nitrato por amonio podría estar mediada por un mecanismo de modificación covalente reversible mediante fosforilación/defosforilación. Nuestros datos serían consistentes con un modelo en el que en ausencia de amonio, la proteína kinasa de la membrana plasmática estuviese en forma activa, fosforilando al transportador de nitrato, o a alguna proteína reguladora del mismo, manteniéndolo en forma activa. Tras la adición de amonio, la proteína kinasa de la membrana plasmática se inactivaría, con la consiguiente defosforilación del transportador o de la posible proteína reguladora, que entrañaría la pérdida de la actividad de transporte de nitrato. Esta hipótesis se está investigando actualmente en nuestro laboratorio.

5. CONCLUSIONES

1. Por los altos niveles de acumulación intracelular de nitrato alcanzados en condiciones de iluminación, así como por su comportamiento similar al de la estirpe silvestre, la estirpe mutante *A. nidulans* R2 FM6, carente de actividad nitrato reductasa, es un sistema idóneo para la caracterización cinética y bioenergética del transporte de nitrato
2. El transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6 es estrictamente dependiente del mantenimiento del gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática de la célula.
3. La manifiesta dependencia por Na^+ que presenta el transporte de nitrato en *A. nidulans* R2 FM6, junto a detallados estudios cinéticos permiten proponer un simporte $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$ como mecanismo para el transporte. En este modelo, el sustrato para el transportador es el NaNO_3 , actuando además el Na^+ como un activador no esencial del sistema. El simporte $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$ explica el acoplamiento energético entre gradiente electroquímico de Na^+ y transporte de nitrato.
4. El transporte de nitrato en *A. nidulans* se encuentra sometido al mismo tipo de regulación por fuente de nitrógeno que los enzimas implicados en la reducción del nitrato. El amonio

determina la represión del sistema, y el nitrato no se requiere como inductor.

5. Se ha identificado a un polipéptido de 47 kDa de la membrana plasmática de *A. nidulans* como componente esencial del sistema de transporte de nitrato.

6. En la membrana plasmática de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato existe una actividad proteína kinasa dependiente de Mg^{2+} capaz de fosforilar "in vitro" determinados polipéptidos de la membrana, entre ellos al de 47 kDa identificado como componente esencial del sistema de transporte de nitrato. Esta proteína kinasa es sensible al amonio y podría estar implicada en el sistema de transducción de señales que, desencadenado por el amonio, produce la inactivación reversible del transporte de nitrato.

6. BIBLIOGRAFIA

- Åberg, B. (1947). On the mechanism of the toxic action of chlorates and some related substances upon young wheat plants. *Ann. R. Agric. Coll. Sweden* 15:37-107.
- Allen, M.B., (1952). The cultivation of Myxophyceae. *Arch. Mikrobiol.* 17:34-53.
- Allen, M.M. (1968). Simple conditions for the growth of the unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4:1-4.
- Allen, M.B. y Arnon, D.Y. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. II. The sodium requirement of *Anabaena cylindrica*. *Physiologia Pl.* 8:653-660.
- Allen, J.F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098:275-335.
- Allen, J.F., Sanders, C.E. y Holmes, N.G. (1985). Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Lett.* 193:271-275.
- Andriessse, X., Bakker, H., Weisbeek, P. (1990). Analysis of nitrate reduction genes in cyanobacteria. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 303-307. Springer. Berlin.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y. and Wada, K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll *a* and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 357:231-245.
- Atwood, J.G., Schmidt, G.J. y Slavin, W. (1979). Improvements in liquid chromatography column life and method flexibility by saturating the mobile phase with silica. *J. Chromatogr.* 171:109-115.
- Batterton, J.C. y Van Baalen, C. (1971). Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration. *Arch. Mikrobiol.* 76:151-165.
- Bilbao, M.M., Gabas, J.M. y Serra, J.L. (1981). Inhibition of nitrite uptake in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by nitrate, ammonium ions and some L-amino-acids. *Biochem. Soc. Trans.* 9:476-477.
- Blanco, F., Alaña, A., Llama, M.J. y Serra, J.L. (1989). Purification and properties of the glutamine synthetase from the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 171: 1158-1165.

- Bloye, S.A., Silman, N.J., Mann, N.H. y Carr, N.G. (1992). Bicarbonate concentration by *Synechocystis* PCC 6803. Modulation of protein phosphorylation and inorganic carbon transport by glucose. *Plant Physiol.* 99:601-606.
- Blumwald, E., Wolosin, J.M. y Packer, L. (1984). Na⁺/H⁺ exchange in the cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:452-459.
- Blumwald, E., Cragoe, E.J. y Poole, R.J. (1987). Inhibition of Na⁺/H⁺ antiport activity in sugarbeet tonoplast by analogs of amiloride. *Plant Physiol.* 85:30-33.
- Bourret, R.B., Borkovich, K.A. y Simon, M. (1991). Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 60:401-441.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown, I.I., Fadeyev, S.I., Kirik, I.I., Severina I.I. y Skulachev, V.P. (1990). Light-dependent $\Delta\mu_{Na^+}$ -generation and utilization in the marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett.* 270:203-206.
- Brownell, P.F. y Nicholas, D.J.D. (1967). Some effects of sodium on nitrate assimilation and N₂ fixation in *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiol.* 42:915-921.
- Calero, F., Ullrich, W.R., Aparicio, P.J. (1980). Regulation by monochromatic light of nitrate uptake in *Chlorella fusca*. En: "The blue light syndrome (H. Senger, Ed.). pp. 411-421. Springer. Berlin Heidelberg New York.
- Candau, P. (1979). Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Candau, P., Manzano, C. y Losada, M. (1976). Bioconversion of light energy into chemical energy through reduction with water of nitrate to ammonia. *Nature* 262:715-717.
- Cawse, P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst.* 92: 311-315.

- Cleland, W.W. (1979). Substrate inhibition. *Meth. Enzymol.* 63:500-513.
- Córdoba, F., Cárdenas, J. y Fernández, E. (1986). Kinetic characterization of nitrite uptake and reduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 82:904-908.
- Coronil, T. (1992). Interacciones carbono-nitrógeno en *Anacystis nidulans*: cambios en aminoácidos y otros metabolitos en función de las condiciones de asimilación de ambos bioelementos. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Coronil, T. y Lara, C. (1991). Amino acid levels and expression of the nitrate assimilation system in *Anacystis nidulans* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 29:651-655.
- Cove, D.J. (1976). Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: The selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36:191-203.
- Cozzone, A.J. (1988). Protein phosphorylation in prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:97-125.
- Deane-Drumond, C.E. (1984). Nitrate transport into *Chara corallina* cells using $^{36}\text{ClO}_3^-$ as analogue for nitrate. *J. Exp. Bot.* 35:1289-1298.
- Deane-Drumond, C.E. y Glass, A.D.M. (1982). Nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Plant Physiol.* 70:50-54.
- Dewar, M.A. y Barber, J. (1973). Cation regulation in *Anacystis nidulans*. *Planta* 113:143-155.
- Dhugga, K.S., Waines J.G. y Leonard, R.T. (1988). Nitrate absorption by corn roots. Inhibition by phenylglyoxal. *Plant Physiol.* 86:759-763.
- Doddema, H. y Telkamp, G. P. (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. *Physiol. Plant.* 45:332-338.
- Eddy, A.A. y Hopkins, G. (1985). The putative electrogenic nitrate-proton symport of the yeast *Candida utilis*. *Biochem. J.* 232:291-297.
- Espie, G.S., Miller, A.G. y Canvin, D.T. (1988). Characterization of the Na^+ -requirement in cyanobacterial photosynthesis. *Plant Physiol.* 88:757-763.
- Falkner, G., Horner, F., Werdan, K. y Heldt, H.W. (1976). pH changes in the cytoplasm of the blue green alga *Anacystis nidulans* caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. *Plant Physiol.* 58:717-718.

- Fay, P. (1983). The Blue-Green. "Studies in Biology", 160. Edward Arnold. London.
- Fernández-Valiente, E. y Avedaño, C. (1993). Sodium-stimulation of phosphate uptake in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119. *Plant Cell Physiol.* 34:201-207.
- Fernández-Valiente, E., Zamoro, I, Sánchez-Maeso, E. y Bonilla, I. (1984). Protection by CO₂ against sodium deficiency in a mutant of *Nostoc muscorum*. *J. Plant Physiol.* 116:473-476.
- Florencio, F.J. y Ramos, J.L. (1985). Purification and characterization of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 838: 39-48.
- 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., Ramos, J.L., Herrero, A. y Guerrero, M.G. (1983a). Nitrate assimilation by cyanobacteria. En: "Photosynthetic prokaryotes: Cell differentiation and function" (G.C. Papageorgiou y L. Packer, Eds). pp. 363-387. Elsevier/North-Holland. Amsterdam.
- Flores, E., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1983b). 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. (1983c). Regulatory interaction of photosynthetic nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 725: 529-532.
- Fuggi, A. (1985). Mechanism of proton-linked nitrate uptake in *Cyanidium caldarium*, an acidophilic non-vacuolated alga. *Biochim. Biophys. Acta* 815:392-398.
- Fuggi, A. (1989). Competition between nitrate and nitrite as a tool to study regulation of nitrate metabolism by ammonium in the microalga *Cyanidium caldarium*. *Plant Physiol. Biochem.* 27:563-568.
- Fuggi, A. (1990). Uptake of inorganic nitrogen compounds in an acidophilic alga. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 66-72. Springer. Berlin.

- Fuggi, A., Di Martino Rigano, V., Vona, V. y Rigano, C. (1981). Nitrate and ammonium assimilation in algal cell suspensions and related pH variations in the external medium, monitored by electrodes. *Plant Sci. Lett.* 23:129-138.
- García-González, M., Sánchez-Maeso, E., Quesada, A. y Fernández-Valiente, E. (1987). Sodium requirement for photosynthesis and nitrate assimilation in a mutant of *Nostoc muscorum*. *J. Plant Physiol.* 127:423-429.
- Glass, A.D.M., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J. y Rufty, T.W., Jr. (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. II Energetics. *Plant Physiol.* 93:1585-1589.
- Glazer, A.N. (1976). The chemical modification of proteins by group-specific and site-specific reagents. En: "The proteins", Vol II. (H. Neurath y R.L. Hill, Eds). pp. 1-88. Academic Press Inc. New York.
- Guerrero, M.G. y Lara, C. (1987). Assimilation of inorganic nitrogen. En: "The cyanobacteria" (P. Fay y C. Van Baalen, Eds). pp. 163-186. Elsevier Science Publisher.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 273-278.
- Guerrero, M.G., Romero, J.M., Rodríguez, R. y Lara, C. (1990). Nitrate transport in cyanobacteria. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 79-85. Springer. Berlin.
- Hattori, A. y Myers J. (1966). Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. *Plant Physiol.* 41:1031-1036.
- Hattori, A. y Myers J. (1967). Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. II. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Cell Physiol.* 8:327-337.
- 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.
- Heldt H.W. (1980). Measurement of metabolite movement across the envelope and of pH in the stroma and the thylakoid space in intact chloroplasts. *Meth. Enzymol.* 69:604-613.
- Hellebust, J.A. (1978). Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effects of ions, ionophores and metabolic and transport inhibitors. *J. Phycol.* 14:79-83.

- Herrero, A. y Guerrero, M.G. (1986). Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Gen. Microbiol. 132:2463-2468.
- Herrero, A., Flores, E. y Guerrero, M.G. (1981). Regulation of the 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. (1985). Regulation of the nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. FEMS Microbiol. Lett. 26:21-25.
- Ida, S. y Mikami, B. (1983). Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Plant Cell Physiol. 24:649-658.
- John, P. (1977). Aerobic and anaerobic bacterial respiration. J. Gen. Microbiol. 98:231-238.
- Kaplan, A., Volokita, M., Zenvirth, D. y Reinhold, L. (1984). An essential role for sodium in the bicarbonate transporting system of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. FEBS Lett. 176:166-168.
- Kaplan, A., Scherer, S. y Lerner, M. (1989). Nature of the light-induced H⁺ efflux and Na⁺ uptake in cyanobacteria. Plant Physiol. 89:1220-1225.
- Kleyman, A. y Cragoe, E.J. Jr. (1990). Cation transport probes: The amilorides series. Meth. Enzymol. 191:739-755.
- Klittich, C.J.R. y Leslie, J.F. (1989). Chlorate-resistant, nitrate utilizing (crn) mutants of *Fusarium moniliforme* (*Giberella fujikuroi*). J. Gen. Microbiol. 135: 721-727.
- Kratz, W.A. y Myers, J. (1955). Nutrition and growth of several blue-green algae. Am. J. Bot. 42:282-287.
- LaBrie, S.T., Wilkinson, J.Q. y Crawford, N.M. (1991). Effect of chlorate treatment on nitrate reductase and nitrite reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 97:873-979.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

- Lara, C. (1992). Photosynthetic Nitrate assimilation: Interactions with CO₂ fixation. En: "Trends in Photosynthesis Research (J. Barber, M.G. Guerrero y H. Medrano, Eds.). pp. 195-208. Intercept. Andover.
- Lara, C. y Guerrero, M.G. (1989). The photosynthetic assimilation of nitrate and its interactions with CO₂. En: "Techniques and new developments in photosynthesis research" (J. Barber y R. Malkin, Eds). pp. 393-411. Plenum. New York.
- Lara, C., Romero, J.M. y Guerrero, M.G. (1987). Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. 169:4376-4378.
- Lara, C., Rodríguez, R. y Guerrero, M.G. (1993). Sodium-dependent nitrate transport and energetics of cyanobacteria. J. Phycol. 29:389-395.
- London, W.P. y Steck, T.L. (1969). Kinetics of enzyme reactions with interaction between a substrate and a (metal) modifier. Biochemistry 8:1767-1779.
- Losada, M. y Guerrero, M.G. (1979). The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. En: "Photosynthesis in relation to model systems (J. Barber, ed). pp. 365-408, Elsevier/North Holland. Amsterdam.
- Losada, M., Hervas, M., y Ortega, J.M. (1987). Photosynthetic assimilation of the primordial bioelements. En: "Inorganic nitrogen metabolism" (W.R. Ullrich, P.J. Aparicio, P.J. Syrett y F. Castillo, Eds). pp. 3-15, Springer. Berlin.
- 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 from *Synechococcus* sp PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. Plant Mol. Biol. 21:1201-1205.
- Madueño, F., Flores, E. y Herrero, A. (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 mutants 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.

- Mann, N.H., Rippka, R. y Herdman, M. (1991). Regulation of protein phosphorylation in the cyanobacterium *Anabaena* strain PCC 7120. J. Gen. Microbiol. 137: 331-339.

- 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.

- 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.

- McClure, P.R., Omholdt, T.E. y Pace, G.M. (1986). Anion uptake in maize roots: Interactions between chlorate and nitrate. Physiol. Plant. 68:107-112.

- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M. y Shaff, J.E. (1990a). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I Effects of nitrate on the membrane potential. Plant Physiol. 93:281-289.

- McClure, P.R., Kochian, L.V., Spanswick, R.M. y Shaff, J.E. (1990b). Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. Plant Physiol. 93:290-294.

- McKinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140:315-322.

- Meeks, J.C., Wycoff, K.L., Chapman, J.S. y Enderlin, C.S. (1983). Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. App. Environ. 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.

- Mérida, A., Leurentop, L., Candau, P. y Florencio, F.J. (1990). Purification and properties of glutamine synthetase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. J. Bacteriol. 172:4732-4735.

- Mikami, B. e Ida, S. (1984). Purification and molecular properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Biochim. Biophys. Acta* 791: 294-304.
- Mifflin, B.J. y Lea, P.J. (1982). Ammonia assimilation and amino acid metabolism. En: "Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol 14 A (D. Boulder y B. Parthier, Eds.). pp. 3-64. Springer. Berlin.
- Miller, A.G. y Calvin, D.T. (1985). Distinction between HCO_3^- and CO_2 dependent photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* based on the selective response of HCO_3^- transport to Na^+ . *FEBS Lett.* 187:29-32.
- Miller, A.G., Turpin, D.H. y Calvin, D.T. (1984). Na^+ requirement for growth, photosynthesis, and pH regulation in the alkalotolerant cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *J. Bacteriol.* 159:100-106.
- Miller, A.G., Espie, G.S. y Calvin, D.T. (1990). Physiological aspects of CO_2 and HCO_3^- transport by cyanobacteria: a review. *Can. J. Bot.* 68:1291-1302.
- Mochizuki-Oda, N. y Oosawa, F. (1985). Amiloride-sensitive Na^+ - H^+ antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 163:395-397.
- Molitor, V. y Peschek, G.A. (1985). Respiratory electron transport in plasma and thylakoid membrane preparations from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 195:145-150.
- Moolenaar, W.H., Tertoolen, L. y De Laat, S.W. (1984). The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259:7563-7570.
- Morrison, J.F. (1979). Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. *Meth. Enzymol.* 63: 257-294.
- Nakagawa, H. y Yamashita, N. (1986). Chlorate reducing activity of spinach nitrate reductase. *Agric. Biol. Chem.* 50:1893-1894.
- Nitschmann, W.H. y Packer, L. (1992). NMR studies on Na^+ transport in *Synechococcus* PCC 6311. *Arch. Biochem. Biophys.* 294:347-352.
- Nitschmann, W.H., Schmetterer, G., Muchl, R. y Peschek, G.A. (1982). Active sodium extrusion reduces net efficiencies of oxidative phosphorylation in the strictly photoautotrophic cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 682:293-296.

- Nohno, T., Noji, S., Taniguchi, S. y Saito, T. (1989). The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. *Nucleic Acids Res.* 17:2947-2957.
- Noji, S., Nohno, T., Saito, T. y Taniguchi, S. (1989). The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. *FEBS Lett.* 252:139-143.
- Ohmori, M., Ohmori, K. y Strotmann, 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. y Ogawa, T. (1986). Biosynthesis of a 42-kDa polypeptide in the cytoplasmic membrane of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* strain R2 during adaptation to low CO₂ concentration. *Plant Physiol.* 80: 525-530.
- 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.* 86:6612-6616.
- Omata, T., Andriessse, 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.
- Oostindier-Braaksma, F.J. y Fenestra, W. J. (1973). Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mutat. Res.* 19:175-185.
- 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.
- Orr, J.L., Keefer, L.M., Keim, P., Nguyen, T.D., Wellems, T., Heinrikson, 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.
- Paris, S. y Pouyssegur, J. (1983). Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na⁺-H⁺ antiport in chinese hamster lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 258:3503-3508.

- Paschinger, H. (1977). DCCD induced sodium uptake by *Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. 113:285-291.
- Peschek, G.A. (1979). Nitrate and nitrite reductase and hydrogenase in *Anacystis nidulans* grown in Fe- and Mo-deficient media. FEMS Microbiol. Lett. 6:371-374.
- Peschek, G.A., Czerny, T., Schmetterer, G. y Nitschmann, W.H. (1985). Transmembrane proton electrochemical gradients in dark aerobic and anaerobic cells of the cyanobacterium (blue-green alga) *Anacystis nidulans*. Plant Physiol. 79:278-284.
- Ramos, J.L. y Guerrero, M.G. (1983). Involvement of ammonia metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation in *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. Arch. Microbiol. 136:81-83.
- Ramos, J.L., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1982). Photoproduction of ammonia from nitrate by *Anacystis nidulans* cells. Biochim. Biophys. Acta 679:323-330.
- Reed, R.H., Warr, S.R.C., Richardson, D.L., Moore, D.J. y Stewart, W.D.P. (1985). Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. FEMS Microbiol. Lett. 28:225-229.
- Rees, T.A.V., Cresswell, R.C. y Syrett, P.J. (1980). Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by a marine-diatom. Biochim. Biophys. Acta 596:141-144.
- Riddell, F.G., Arumugan, S. y Cox, B.G. (1988). The monensin-mediated transport of Na⁺ and K⁺ through phospholipid bilayers studied by ²³Na- and ³⁹K-NMR. Biochim. Biophys. Acta 994: 279-284.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. y Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111:1-61.
- Ritchie, R.J. (1991). Membrane potential and pH control in the cyanobacterium *Synechococcus* R2 (*Anacystis nidulans*) PCC 7942. J. Plant Physiol. 137:409-418.
- Ritchie, R.J. (1992a). Sodium transport and the origin of the membrane potential in the cyanobacterium *Synechococcus* R2 (*Anacystis nidulans*) PCC 7942. J. Plant Physiol. 139:320-330.

- Ritchie, R.J. (1992b). The cyanobacterium *Synechococcus* R2 (*Anacystis nidulans*, *S. leopoliensis*) PCC 7942 has a sodium-dependent chloride transporter. *Plant Cell Environ.* 15:163-177.
- Romero, J.M. y Lara, C. (1987). Photosynthetic assimilation of NO_3^- by intact cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Influence of NO_3^- and NH_4^+ assimilation on CO_2 fixation. *Plant Physiol.* 83:208-212.
- Romero, J.M., Lara, C. y Guerrero, M.G. (1985). Dependence of nitrate utilization upon active CO_2 fixation in *Anacystis nidulans*: a regulatory aspect of the interaction between photosynthetic carbon a nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:396-401.
- Romero, J.M., Coronil, T., Lara, C. y Guerrero, M.G. (1987). Modulation of nitrate uptake in *Anacystis nidulans* by the balance between ammonium assimilation and CO_2 fixation. *Arch. Biochem. Biophys.* 256:578-584.
- Romero, J.M., Lara, C. y Sivak, M.N. (1989a). Changes in net O_2 exchange induced by inorganic nitrogen in the blue green alga *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 91:28-30.
- Romero, J.M., Lara, C. y Guerrero, M.G. (1989b). Determination of intracellular nitrate. *Biochem. J.* 259:545-548.
- Rona, J.P., Monestiez, M., Pennarum, A.M., Convert, M., Cornel, D., Bousquet, U., Kiolle, R. y Marigo, G. (1990). Nitrate uptake in *Catharanthus roseus* cells: electrophysiological effects. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 61-65. Springer. Berlin.
- Ruiz, M.T., Cejudo, F.J., Muñoz-Centeno, M.C. y Paneque, A. (1990). Isolation and characterization of an *Azotobacter chroococcum* mutant deficient in nitrate transport. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:211-214.
- Ruiz, M.T., Muñoz-Centeno, M.C., Cejudo, F.J. and Paneque, A. (1992). Nitrite uptake in *Azotobacter Chroococcum*. *Arch. Microbiol.* 157:546-548.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N. (1988). Sodium-dependent transport of neutral amino acids by whole cells and membrane vesicles of *Streptococcus bovis*, a ruminal bacterium. *J. Bacteriol.* 170:3531-3536.
- 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.

- Sanders, C.E., Melis, A. y Allen, J.F. (1989). In vivo phosphorylation of proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 after chromatic acclimation to photosystem I or Photosystem II light. *Biochim. Biophys. Acta* 976:168-172.
- Sawa, Y., Ochiai, H., Yoshida, K., Tanizawa, K., Tanaka, H, y Soda, K. (1988). Glutamine synthetase from a cyanobacterium *Phormidium lapideum*: Purification, characterization and comparison with other cyanobacterial enzymes. *J. Biochem.* 104:917-923.
- Schlee, J., Cho, B. y Komor, E. (1985). Regulation of nitrate uptake by glucose in *Chlorella*. *Plant Sci. Lett.* 39:25-30.
- Scherer, S., Stürzl, E. y Böger, P. (1984). Oxygen-dependent proton efflux in cyanobacteria (blue-green algae). *J. Bacteriol.* 158:609-614.
- Schloemer, R.H. y Garrett, R.H. (1974a). Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* 118:259-269.
- Schloemer, R.H. y Garrett, R.H. (1974b). Uptake of nitrite by *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* 118:270-274.
- Segel, I.H. (1975). *Enzymes Kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.* Wiley- Interscience. New York.
- Serra, J.L., Alaña, A., Blanco, F. y Llama, M.J. (1985). Purification of glutamine synthetase from the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochem. Soc. Transact* 13:384-385.
- Serra, J.L., Arizmendi, J.M., Blanco, F., Martinez-Bilbao, M., Alaña, A., Fresnedo, O. Urkijo, I. y Llama, M.J. (1990). Nitrate assimilation in the non-N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 196-202. Springer. Berlin.
- Serrano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. En: "The molecular and cellular biology of the yeast *Sacharomyces*: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics". (J.R. Broach, J.R. Pringle y E.W. Jones, Eds.). pp.523-585. Cold Spring Harbor.
- Siddiqi, M.Y., King, B.J. y Glass, A.D.M. (1992). Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 100:644-650.

- 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.* 158:257-262.
- Skulachev, V.P. (1985). Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic functions of sodium: H⁺ is not unique as a coupling ion. *Eur.J. Biochem.* 151:199-208.
- Solomonson, L.P. y Vennesland, B. (1972). Nitrate reductase and chlorate toxicity in *Chorella beijerinck*. *Plant Physiol.* 50:421-424.
- Stacey, G., Tabita, F.R. y Van Baalen, C. (1977). Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: purification of glutamine synthetase from *Anabaena* sp. Strain CA. *J. Bacteriol.* 132:596-603.
- Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J. y Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.
- Suzuki, I., Omata, T. y Sugiyama, T. (1992). Gene expression and regulation of nitrate assimilating enzymes in *Synechococcus* PCC 7942. En: "Research in Photosynthesis", Vol. 4 (N. Murata, Ed.). pp. 75-78. Kluwer. Dordrecht.
- Syrett, P.J. (1988). Uptake and utilization of nitrogen compounds. En: "The biochemistry of the algae and cyanobacteria" (L.J. Rogers y J.R. Gallon, Eds). pp. 23-39. Clarendon Press. Oxford.
- Tate, S.S. y Meister, A. (1973). Glutamine synthetases of mammalian liver and brain. En: "The enzymes of glutamine metabolism" (S. Prusiner y E.R. Stadtman, Eds). pp. 77-127. Academic Press Inc. New York.
- Tischner, R. y Lorenzen, H. (1981). Nitrate uptake and reduction in *Chlorella*. Characterisation of nitrate uptake in nitrate-grown and nitrogen-starved *Chlorella sorokiniana*. En: "Biology of inorganic nitrogen and sulfur" (H. Bothe y A. Trebst, Eds). pp. 252-259. Springer. Berlin.
- Tischner, R. y Schmidt, A. (1984). Light-mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. *Arch. Microbiol.* 137:151-154.
- Thibaud, J.B. y Grignon, C. (1981). Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Sci. Lett.* 22:279-289.

- Tsay, Y.F., Schroeder, J. I., Feldmann, K.A. y Crawford, N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL 1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell* 72:705-713.
- Tsinoremas, N.F., Castets, A.M., Harrison, M.A., Allen, J.F. y Tandeau de Marsac, N. (1991). Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of posttranslational modification of the *glnB* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4565-4569.
- Ullrich, C.I. y Novacky, A.J. (1990). Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO_3^- uptake and fusicoccin in roots hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiol.* 94:1561-1567.
- Ullrich, W.R. (1992). Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. En: "Nitrogen metabolism of plants" (K. Mengel y D.J. Pilbeam, Eds.). pp. 121-137. Clarendon Press. Oxford.
- Ullrich, W.R. y Novacky, A.J. (1981). Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemna gibba* G1. *Plant Sci. Lett.* 22:211-217.
- Ullrich, W.R., Lesch, S., Jarczy, K.L., Herterich, M. y Trogisch, G.D. (1990). Transport of inorganic nitrogen compounds: physiological studies on uptake and assimilation. En: "Inorganic nitrogen in plants and microorganisms" (W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi y P.J. Aparicio, Eds). pp. 44-50. Springer. Berlin.
- Unkles, S.E., Hawker, K.L., Grieve, C., Campbell, E.I., Montague, P. y Kinghorn, J.R. (1991). *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:204-208.
- 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.
- Walker, D. (1988). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Research Institute for Photosynthesis. University of Sheffield. U.K.

- Walter, K. y Schütt, C. (1974). Alkalische phosphatase im serum. En: "Methoden der enzymatischen analyse" Band 1 (H.U. Bergmeyer, Ed). pp. 893-897. Verlag Chemie. Weinheim/Bergstr.
- Wolk, C.P. (1973). Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. Bacteriol. Rev. 37:32-101
- Wolk, C.P. (1980). Cyanobacteria (Blue-green Algae). En: "The biochemistry of plants" Vol 1 (P.K. Stumpf y E.E. Conn, Eds). pp 659-686. Academic Press. New York.
- Yabuki, Y., Mori, E. y Tamura, G. (1985). Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Agric. Biol. Chem. 49:3061-3062.
- Zevenboom, W., De Groot, G.J. y Mur, L.R. (1980). Effects of light on nitrate-limited *Oscillatoria agardhii* in chemostat cultures. Arch. Microbiol. 125: 59-65.

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ

Trabajo de Grado de Maestría en Ciencias Exactas y Naturales
en el día de la fecha se le otorga el título de

MARIA DEL ROJO RODRIGUEZ JANCHEZ

por el trabajo de grado titulado TRANSPORTE DE NITRATO EN LA CIANOBACTERIA

Anacystis nidulans

Apto con Lode

por unanimidad

17

Septiembre

93

J. M. Vel

Pedro Juan

~~J. M. Vel~~

~~M. Vel~~

~~J. M. Vel~~

~~J. M. Vel~~



500408327

FBI E TD-245

408327