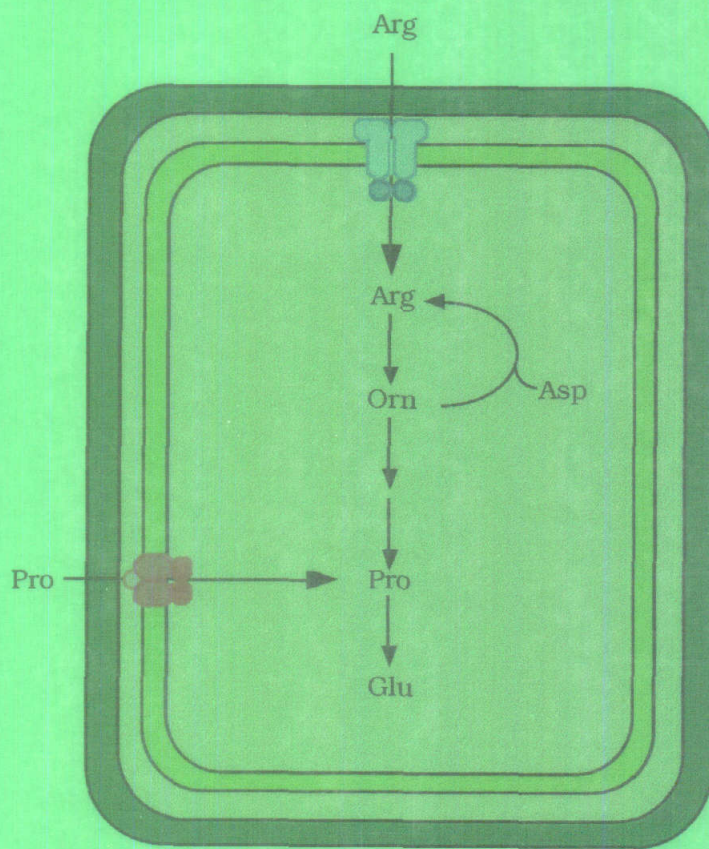


TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS Y CATABOLISMO
DE ARGININA Y PROLINA EN LA CIANOBACTERIA
SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803



M^a José Quintero Carrasco
Sevilla, 2000

TD 475

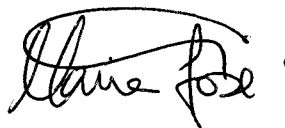
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales
Departamento de Economía y Estadística
Código: 157 número: 14 del libro
correspondiente a: 17 FEB, 2000
Sevilla.

El Jefe del Negociado
Fluor Vaffio

**TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS Y CATABOLISMO DE
ARGININA Y PROLINA EN LA CIANOBACTERIA
SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803**

Trabajo presentado para optar al grado
de Doctora en Biología por la Licenciada
M^a José Quintero Carrasco



Sevilla, Abril de 2000

Director:



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

Directora:



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

Tutor:



Dr. José María Romero Rodríguez
Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	15
1.2. ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN LAS CIANOBACTERIAS	16
1.3. TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS	18
1.3.1. Sistemas de transporte secundario	19
1.3.2. Sistemas de transporte "tipo ABC"	20
1.3.3 Transporte de aminoácidos en cianobacterias	22
1.4. CATABOLISMO DE ARGININA Y PROLINA	23
1.4.1. Catabolismo de arginina	23
1.4.2. Catabolismo de prolina	25
1.4.3. Catabolismo de aminoácidos en cianobacterias	25
1.5. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	29
2.1.1. Cianobacterias	29
2.1.1.1. Estirpe empleada	29
2.1.1.2. Condiciones de cultivo	29
2.1.1.3. Curvas de crecimiento	30
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	30
2.1.2.1. Estirpes empleadas	30
2.1.2.2. Condiciones de cultivo	31
2.1.3. Métodos de recogida y lavado de células	31
2.2. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS	31
2.3. ENSAYOS DE CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	32
2.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	33
2.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	33
2.5.1. Ensayos de actividad ornitina transcarbamilasa	33
2.5.2. Ensayos de actividad arginasa en células permeabilizadas	34
2.5.3. Ensayos de actividad arginasa y agmatinasa en extractos crudos	35

2.5.3.1. Obtención y preparación de las muestras	35
2.5.3.2. Actividad arginasa	35
2.5.3.3. Actividad agmatinasa	35
2.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES	36
2.6.1. Determinación de clorofila	36
2.6.2. Determinación de proteína	37
2.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA	37
2.7.1. Plásmidos utilizados	37
2.7.2. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala	38
2.7.2.1. Lisis alcalina (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	38
2.7.2.2. Procedimiento de Holmes y Quigley (1981)	38
2.7.3. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a escala mediana	38
2.7.4. Aislamiento de DNA total de <i>Synechocystis</i> sp.	39
2.7.5. Determinación de la concentración de DNA	39
2.7.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	39
2.7.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	40
2.7.8. Restricción del DNA	40
2.7.9. Desfosforilación del DNA	41
2.7.10. Relleno de extremos 5' protuberantes	41
2.7.11. Ligación de DNA	42
2.7.12. Marcaje radiactivo de sondas de DNA	42
2.7.13. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas de DNA (análisis de Southern)	42
2.7.14. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	43
2.7.15. Secuenciación de DNA	44
2.8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS	45
2.8.1. Transformación de <i>E. coli</i>	45
2.8.2. Transformación de <i>Synechocystis</i> sp.	46
2.9. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS	47
3. RESULTADOS	49
3.1. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	51
3.1.1. ORFs investigadas y metodología utilizada	51
3.1.2. Identificación de genes responsables del transporte de aminoácidos neutros	53
3.1.3. Identificación de genes responsables del transporte de aminoácidos básicos y glutamina	57

3.1.3.1. Generación y caracterización de los mutantes BgtA y BgtB	57
3.1.3.2. Ensayos de crecimiento de los mutantes Bgt	63
3.1.4. Generación y análisis de mutantes dobles de los transportadores Bgt y Nat	66
3.1.5. Identificación del gen <i>gltS</i> de transporte de glutamato	71
3.1.6. Identificación de un nuevo sistema de transporte de glutamato	78
3.1.7. Inactivación de las ORFs <i>slr0401</i> y <i>slr1257</i>	82
3.2. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	85
3.2.1. Catabolismo de la prolina	85
3.2.1.1. Generación de un mutante <i>putA</i>	85
3.2.1.2. Destino metabólico de la [¹⁴ C]prolina	86
3.2.1.3. Crecimiento de la estirpe mutante CSMJ15	88
3.2.2. Catabolismo de la arginina y la ornitina	89
3.2.2.1. Ensayos de catabolismo de la arginina y la ornitina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	89
3.2.2.2. Mutantes de las ORFs <i>sll0228</i> y <i>sll1077</i>	92
3.2.2.3. Generación y fenotipo de mutantes <i>argF</i> , <i>argD</i> y <i>proC</i>	97
3.2.2.4. Catabolismo de la arginina y la ornitina en las estirpes CSMJ1, CSMJ15, CSMJ16a y CSMJ39b	101
3.2.2.5. Mutantes dobles de la ruta de catabolismo de la arginina	110
3.2.2.6. Crecimiento con arginina como fuente de nitrógeno	112
4. DISCUSIÓN	113
4.1. ESTUDIO DE ORGANISMOS CON GENOMIO SECUENCIADO	115
4.2. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	115
4.3. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	123
5. CONCLUSIONES	131
6. BIBLIOGRAFÍA	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Algunas rutas de degradación de arginina comunes en bacterias.	24
Figura 2.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ36b, CSMJ37b, CSMJ41a y CSMJ41b.	55
Figura 3.	Perfil de hidrofobicidad de la proteína hipotética determinada por la ORF <i>sll1270</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	57
Figura 4.	Representación esquemática de las ORFs <i>sll1270</i> y <i>slr1735</i> del cromosoma de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y su inactivación mediante inserción de casetes de resistencia a antibióticos.	58
Figura 5.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.	59
Figura 6.	Estudio de la estructura de la región cromosómica conteniendo la nueva mutación introducida en las estirpes CSMJ11a y CSMJ11b.	63
Figura 7.	Curvas de crecimiento con nitrato o arginina como fuente de nitrógeno de los mutantes CSMJ7 (<i>bgtB</i>), CSMJ8a (<i>bgtA</i>) y CSMJ11a (<i>bgtA</i> , <i>bgtB</i>).	64
Figura 8.	Ensayo de crecimiento de la estirpe PCC 6803 y estirpes mutantes del sistema Bgt en presencia de algunos aminoácidos y análogos de aminoácidos.	65
Figura 9.	Estudio de la estructura de la región cromosómica conteniendo la nueva mutación introducida en las estirpes CSMJ24, CSMJ26, CSMJ30 y CSMJ32.	67
Figura 10.	Cálculo de la K_S para la glutamina de la estirpe CSMJ8a.	70
Figura 11.	Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto de la ORF <i>slr1145</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Kaneko <i>et al.</i> , 1996) con la de las proteínas GltS de <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Escherichia coli</i> .	72
Figura 12.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en la estirpe CSMJ6a.	74
Figura 13.	Transporte de glutamato en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en presencia de distintas concentraciones de sodio.	77
Figura 14.	Representación esquemática de la disposición en el cromosoma de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 de las ORFs <i>sll1102</i> , <i>sll1103</i> y <i>sll1104</i> (Kaneko <i>et al.</i> , 1996).	78

Figura 15.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSX67 y CSX68.	79
Figura 16.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ35a, CSMJ35b y CSMJ38b.	83
Figura 17.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en la estirpe CSMJ15.	86
Figura 18.	Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]prolina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ15.	87
Figura 19.	Crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y CSMJ15 con nitrato y/o prolina como fuente de nitrógeno.	88
Figura 20.	Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]arginina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	90
Figura 21.	Metabolismo a tiempo corto de la [^{14}C]arginina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	91
Figura 22.	Metabolitos marcados con ^{14}C a partir de la [^{14}C]ornitina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	92
Figura 23-I.	Estudio mediante análisis de Southern de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.	94
Figura 23-II.	Análisis mediante PCR de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.	94
Figura 24.	Crecimiento con nitrato o arginina como fuente de nitrógeno de los mutantes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.	95
Figura 25.	Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ1, CSMJ16a, CSMJ16b y CSMJ39b.	99
Figura 26.	Ensayos de crecimiento de las estirpes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, CSMJ1, CSMJ16a y CSMJ16b.	100
Figura 27.	Ensayo de crecimiento de las estirpes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y CSMJ39b.	100
Figura 28.	Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]ornitina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ1.	102
Figura 29.	Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]arginina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ1.	103

- Figura 30. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 104
[^{14}C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ15.
- Figura 31. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 105
[^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ15.
- Figura 32. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 106
[^{14}C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ16a.
- Figura 33. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 107
[^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ16a.
- Figura 34. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 108
[^{14}C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ39b.
- Figura 35. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la 109
[^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe
mutante CSMJ39b.
- Figura 36. Estudio de la estructura de la región cromosómica que contiene la 110
segunda mutación en las estirpes CSMJ18 y CSMJ19.
- Figura 37. Representación esquemática de los transportadores de 116
aminoácidos identificados en *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- Figura 38. Representación esquemática de la ruta de catabolismo de la 123
prolina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- Figura 39. Representación esquemática de la principal ruta de catabolismo de 124
la arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	30
Tabla 2.	Plásmidos utilizados en este trabajo	37
Tabla 3.	ORFs de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas de transporte de otros organismos y que fueron seleccionadas para su estudio en este trabajo.	52
Tabla 4.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs <i>sll0146</i> , <i>sll1102</i> , <i>sll1103</i> , <i>sll1104</i> , <i>sll1270</i> , <i>slr0401</i> , <i>slr0949</i> , <i>slr1145</i> , <i>slr1257</i> , <i>slr1735</i> y <i>slr1881</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	53
Tabla 5.	Actividades de transporte de aminoácidos de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes de las ORFs <i>slr0949</i> , <i>slr1881</i> y <i>sll0146</i> .	56
Tabla 6.	Actividades de transporte de aminoácidos de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.	60
Tabla 7.	Actividades de transporte de aminoácidos básicos y glutamina de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.	61
Tabla 8.	Actividades de transporte de aminoácidos de diversos mutantes de los sistemas de transporte Nat y Bgt de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	68
Tabla 9.	Actividades de transporte de glutamina de mutantes de los sistemas Nat y Bgt de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	69
Tabla 10.	Actividades de transporte de histidina de mutantes Nat y Bgt derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	71
Tabla 11.	Actividades de transporte de aminoácidos de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a.	75
Tabla 12.	Actividades de transporte de glutamato de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a.	76
Tabla 13.	Actividades de transporte de glutamato de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.	77

Tabla 14.	Actividades de transporte de aminoácidos de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.	80
Tabla 15.	Actividades de transporte de glutamina de la estirpe silvestre <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.	81
Tabla 16.	Actividades de transporte de α -cetoglutarato de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.	81
Tabla 17.	Actividades de transporte de glutamato de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.	82
Tabla 18.	Actividades de transporte de aminoácidos de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y la estirpe mutante CSMJ38b.	84
Tabla 19.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de la ORF <i>sll1561</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	85
Tabla 20.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs <i>sll0228</i> y <i>sll1077</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	93
Tabla 21.	Actividades arginasa y agmatinasa de las estirpes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.	96
Tabla 22.	ORFs de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas ArgD, ArgF y ProC.	97
Tabla 23.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs <i>sll0902</i> , <i>slr0661</i> y <i>slr1022</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	98
Tabla 24.	Catabolismo de la [¹⁴ C]arginina y la [¹⁴ C]ornitina en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y en las estirpes mutantes CSMJ18 y CSMJ19.	111
Tabla 25.	Crecimiento con arginina como fuente de nitrógeno de la estirpe PCC 6803 y de algunas estirpes mutantes.	112

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ABC	ATP binding cassette
ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
Ap ^r	Resistencia a la ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-acrilamida	N,N',-metilén-bis-acrilamida
Chl	Clorofila
Cm	Cloranfenicol
Cm ^r	Resistencia al cloranfenicol
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
E	Einstein o coeficiente de extinción (según el contexto)
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
etidio	3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
FAD	Flavín adenosín dinucleótido
<i>g</i>	Fuerza de la gravedad
h	hora
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
Km ^r	Resistencia a la kanamicina
K _S	Constante de semisaturación
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani

MFS	Major facilitator superfamily
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-reducido
ORF	Pauta de lectura abierta
p/v	Relación peso/volumen
P5C	Δ^1 pirrolina-5-carboxilato
pb	Par de bases
P _i	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
psi	libras·pulgadas ⁻²
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm	Estreptomina
Sp	Espectinomicina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletildiamina
TLC	Cromatografía en capa fina
Tricina	N-tris(hidroximetil) metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil) aminoetano
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido

Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Aminoácidos

A	Ala	alanina
R	Arg	arginina
N	Asn	asparragina
D	Asp	ácido aspártico

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

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos que han jugado un papel esencial en la historia de la vida en la Tierra al ser los responsables de la acumulación inicial de oxígeno en la atmósfera como consecuencia de la fotólisis del agua que realizan durante la fotosíntesis oxigénica (Buick, 1992) y ser los precursores evolutivos de los cloroplastos de las algas y de las plantas. Por otro lado, ocupan hábitats muy diversos, habiéndose encontrado especies de cianobacterias prácticamente en todos los ecosistemas en los que se han buscado, y destacando su contribución a la productividad primaria de los océanos (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). Las cianobacterias poseen en su aparato fotosintético clorofila *a* y una serie de pigmentos antena que se denominan ficobiliproteínas (Glazer, 1984). Muchas estirpes de cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas, siendo los únicos organismos que realizan simultáneamente los procesos de fotosíntesis oxigénica y fijación de dinitrógeno.

La fijación de CO₂ atmosférico ocurre fundamentalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin, y parte del CO₂ fijado se acumula como glucógeno. Algunas cianobacterias son capaces también de asimilar glucosa o fructosa, en algunos casos necesitando iluminación para ello, por lo que se pueden clasificar como fotoheterótrofas o heterótrofas facultativas. Tanto el glucógeno de reserva como los azúcares incorporados del medio se metabolizan mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Estos organismos poseen un ciclo de Krebs incompleto, ya que carecen de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) y, por este motivo, la ruta tiene solamente una función anabólica proporcionando α -cetoglutarato para la síntesis de glutamato y sus derivados.

Las cianobacterias son un grupo morfológicamente muy diverso, que incluye estirpes unicelulares y filamentosas. Además, muestran gran diversidad en el contenido G+C de su genomio, encontrándose en ellas un rango de valores tan extenso que se acerca al rango que presenta el conjunto de los procariotas (Herdman *et al.*, 1979).

Un aspecto interesante de algunas cianobacterias es su capacidad de diferenciación celular. Algunas especies filamentosas forman acinetos, que son células de resistencia que se diferencian como respuesta a situaciones ambientales



desfavorables (Nichols y Adams, 1982). También pueden producir células especializadas en la reproducción y dispersión como son los hormogonios (Tandeau de Marsac, 1994) y células especializadas en la fijación de dinitrógeno denominadas heterocistos (Wolk *et al.*, 1994).

En base a sus características morfológicas, las cianobacterias se clasifican en cinco grupos taxonómicos denominados Secciones (Rippka *et al.*, 1979). La Sección I incluye estirpes unicelulares que se dividen por fisión binaria o por gemación; a este grupo pertenecen los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis*. La Sección II está compuesta por estirpes unicelulares que se dividen por fisión múltiple, como las de los géneros *Dermocarpa* o *Pleurocapsa*. La Sección III está formada por estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, por ejemplo las de los géneros *Pseudanabaena*, *Plectonema* y *Spirulina*. La Sección IV incluye estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en un solo plano, por lo que los filamentos no presentan ramificaciones verdaderas, como las de los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix*. Por último, la Sección V agrupa a estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en más de un plano, dando lugar a filamentos ramificados, como las del género *Fischerella*.

La cianobacteria en la que se centra este trabajo es *Synechocystis* sp. PCC 6803 que pertenece, como ya se ha indicado, a la Sección I de la clasificación de Rippka *et al.*, siendo una cianobacteria unicelular, poliploide, móvil y no fijadora de dinitrógeno. *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede crecer a expensas de la glucosa (Rippka *et al.*, 1979) en la luz y en oscuridad, aunque necesitando en este último caso un pulso de luz blanca cada 24 horas (Anderson y McIntosh, 1991). Esta cianobacteria posee la capacidad de incorporar espontáneamente DNA del medio externo, que puede integrarse en su genoma mediante recombinación homóloga (Shestakov y Khyen, 1970), lo cual permite la sustitución de genes por versiones mutadas de los mismos. *Synechocystis* sp. PCC 6803 es un organismo modelo para el estudio del proceso fotosintético, especialmente aquellos aspectos investigados mediante la generación de mutantes (Williams, 1988; Pakrasi *et al.*, 1988; Smart *et al.*, 1994). Estas características, unidas a la disponibilidad de la secuencia completa de su cromosoma (Kaneko *et al.*, 1996), convierten a *Synechocystis* sp. PCC 6803 en un poderoso sistema modelo para el estudio de la biología de las cianobacterias.

1.2. ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias utilizan preferentemente nitrógeno inorgánico para su crecimiento (Flores y Herrero, 1994). Como fuente de nitrógeno inorgánico, estos organismos pueden utilizar nitrato, nitrito y amonio, y algunas estirpes, además,

dinitrógeno. Algunas cianobacterias también son capaces de asimilar fuentes de nitrógeno orgánico, como son la urea o algunos aminoácidos tales como la arginina o la glutamina (Neilson y Larsson, 1980; Flores y Herrero, 1994). Generalmente, las diferentes fuentes de nitrógeno se asimilan mediante la producción intracelular de amonio a partir de las mismas.

La asimilación de nitrato y de nitrito implica su transporte al interior celular mediado por una permeasa que utiliza energía en forma de ATP, aunque en determinadas condiciones estos compuestos pueden también entrar en la célula pasivamente. Una vez en el interior celular el nitrato y el nitrito deben ser reducidos hasta amonio. Para ello, el nitrato se reduce primero hasta nitrito por medio de la enzima nitrato reductasa y, posteriormente, la nitrito reductasa reduce el nitrito hasta amonio. Por otro lado, la asimilación del dinitrógeno implica su reducción mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa, generándose dos moléculas de amonio por cada molécula de N_2 fijada.

En cuanto a la asimilación del amonio externo, éste puede entrar al interior de la célula cianobacteriana mediante difusión de NH_3 a través de la membrana o mediante un transportador. Recientemente, se han descrito en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 los genes que determinan tres permeasas de amonio (Montesinos *et al.*, 1998). El amonio, ya sea el incorporado desde el medio externo o el resultante de la reducción intracelular de otros compuestos orgánicos o inorgánicos, se asimila mediante la ruta glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT). En esta ruta, la GS cataliza la formación, dependiente de ATP, de glutamina a partir de glutamato y amonio. El grupo amido de la glutamina se transfiere después al α -cetoglutarato para originar dos moléculas de glutamato, en una reacción catalizada por la enzima GOGAT que requiere poder reductor. El glutamato y la glutamina generados mediante esta ruta sirven como donadores de nitrógeno para la síntesis de todos los demás compuestos nitrogenados de la célula.

Cuando el amonio se encuentra presente en el medio de cultivo de las cianobacterias, reprime la expresión de proteínas que participan en la asimilación de otras fuentes de nitrógeno alternativas. El metabolismo del amonio a través de la GS es necesario para que este efecto represor tenga lugar, lo que en su día sugirió la existencia de un mecanismo común de regulación por amonio de las proteínas de las distintas vías de asimilación de nitrógeno. Se ha identificado y caracterizado el gen *ntcA*, ampliamente distribuido entre las cianobacterias, que determina un activador transcripcional que regula la expresión de los genes sometidos a control por nitrógeno en las cianobacterias (Vega-Palas *et al.*, 1992; Frías *et al.*, 1993).

Otro aspecto destacable del metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias es la presencia en estos organismos de un material de reserva único en la Naturaleza, los

gránulos de cianoficina, que están compuestos por un copolímero de aspartato y arginina (Simon, 1971; Simon y Weathers, 1976). Estos gránulos varían en tamaño y forma, pero se han descrito en muchas estirpes cianobacterianas unicelulares y filamentosas, fijadoras de nitrógeno y no fijadoras (Simon, 1987). En las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, los gránulos de cianoficina se han encontrado tanto en las células vegetativas como en los heterocistos, donde podrían desempeñar un papel de reserva del nitrógeno fijado (Carr, 1983), de acuerdo con la principal función descrita para estos gránulos como almacén de nitrógeno (Simon, 1973; Allen y Hutchison, 1980; Allen *et al.*, 1980; Mackerras *et al.*, 1990). Los gránulos de cianoficina son insolubles en agua pero solubles en ácidos débiles, propiedad que ha hecho posible su aislamiento intactos. En el análisis de éstos se ha podido comprobar su composición equimolar de L-arginina y L-aspartato y su elevada, aunque variable, masa molecular (25-100 kDa) (Simon, 1971). Su síntesis es no ribosómica (Simon, 1973) y está catalizada por la cianoficina sintetasa, el producto del gen *cphA*, en una reacción dependiente de ATP (Ziegler *et al.*, 1998). En la degradación de los gránulos interviene una cianoficinasa que libera un dipéptido de Asp-Arg como intermediario de la degradación hasta arginina y aspartato (Gupta y Carr, 1981). Recientemente, se ha identificado en *Synechocystis* sp. PCC 6803 una ORF que determina una proteína homóloga a una glicoproteasa, que podría estar relacionada con la degradación de cianoficina (Zuther *et al.*, 1998), y otra ORF que parece determinar la cianoficinasa que libera dipéptidos Asp-Arg, a la que se ha identificado como el gen *cphB* (Richter *et al.*, 1999). Hasta el momento de abordar esta tesis, el catabolismo del aspartato y de la arginina no se había investigado en detalle en ninguna cianobacteria.

1.3. TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS

Las células de todos los organismos vivos poseen sistemas de transporte que median el intercambio de sustancias con el medio externo que las rodea. A través de ellos se incorporan al interior celular moléculas que se requieren para el crecimiento y se excretan, entre otros, solutos tóxicos formados en algunos procesos metabólicos.

En las bacterias Gram-negativas, entre las que se incluyen las cianobacterias, la primera barrera de permeabilidad está constituida por la denominada membrana externa. Esta membrana es altamente impermeable a compuestos tóxicos como antibióticos, toxinas y enzimas líticas, pero permite la difusión de pequeñas moléculas por medio de canales proteicos conocidos con el nombre de porinas. Estos canales generalmente no son específicos, aunque la velocidad de difusión de los solutos a través de ellos a menudo se afecta drásticamente por propiedades fisicoquímicas como son el tamaño, la carga y las características de solubilidad de tales solutos. También hay

canales con sitios de unión específicos que facilitan la difusión de determinadas sustancias, normalmente compuestos demasiado grandes para penetrar rápidamente a través de los canales clásicos de porinas (Nikaido, 1993). Ejemplos de este tipo de canales son la proteína D1 para la glucosa (Hancock y Carey, 1980) y la proteína D2 para los aminoácidos básicos de *Pseudomonas aeruginosa* (Trias y Nikaido, 1990).

Una vez superada la membrana externa y el espacio periplásmico, la estructura que rodea externamente a la célula es la membrana plasmática que presenta un elevado número de sistemas de transporte específicos para distintos sustratos. Estos transportadores se clasifican desde el punto de vista de la energetización del proceso. Se distingue entre el transporte pasivo, que ocurre a favor del gradiente electroquímico del sustrato hasta que se alcanza el equilibrio, y el transporte activo que requiere un aporte de energía y permite la concentración del compuesto en contra de su gradiente electroquímico. La energía necesaria para el transporte activo puede obtenerse mediante la hidrólisis de ATP (transporte primario) o acoplando el transporte al de un ión que se mueva a favor de gradiente (transporte secundario). Con respecto al transporte pasivo, en bacterias se han descrito varios ejemplos como son el transporte de glicerol en *E. coli* mediado por la permeasa GlpF (Heller *et al.*, 1980) o el transporte de glucosa mediado por Glf en *Zymomonas mobilis* (Barnell *et al.*, 1992).

Además, se ha descrito el sistema de transporte de carbohidratos PTS (de "phosphotransferase system") (Postma *et al.*, 1996) que acopla el transporte del soluto a la modificación química del mismo y basa su actividad en la fosforilación de la molécula de azúcar sustrato al mismo tiempo que ésta pasa a través de la membrana, siendo el fosfoenolpiruvato el donador del grupo fosfato.

1.3.1. Sistemas de transporte secundario

Estos transportadores están formados normalmente por una proteína que presenta 10-12 hélices α hidrofóbicas que constituyen dominios de expansión de la membrana y se encuentran englobados en la categoría de facilitadores de tipo portador ("carrier-type facilitators") de Saier (1998).

Estos sistemas acoplan el transporte del sustrato al de iones H^+ o Na^+ , que pueden moverse a favor de gradiente en el mismo sentido (simporte) o en sentido contrario (antiporte) que el sustrato. En base al análisis de las secuencias de aminoácidos de este tipo de permeasas se distinguen en la actualidad más de medio centenar de grupos filogenéticamente diferentes, entre los que se encuentra el amplísimo grupo conocido como MFS (de "major facilitator superfamily") (Saier, 1998). La permeasa monocomponente mejor caracterizada es la de la lactosa (LacY) de *Escherichia coli*, que cataliza un simporte de lactosa y H^+ (Maloney y Wilson, 1996).

Recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo tipo de sistemas de transporte activo denominados TRAP (de "tripartite ATP-independent periplasmic"). De este tipo se ha estudiado un transportador de malato, succinato y fumarato de *Rhodobacter capsulatus* (Forward *et al.*, 1997) que está constituido por una proteína periplásmica de unión de sustrato (DctP) y por dos proteínas transmembrana (DctQ y DctM). En esta permeasa la fuente energizadora del proceso de transporte es el potencial de membrana. Comparaciones de secuencias con los genomios de otros organismos han identificado proteínas homólogas a las de este sistema de transporte en otras bacterias Gram-negativas como son *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Thiosphaera pantotropha*.

1.3.2. Sistemas de transporte "tipo ABC"

Estos sistemas de transporte importan o exportan solutos que pueden ser iones inorgánicos, aminoácidos, azúcares, grandes polisacáridos e incluso proteínas. Algunos son de considerable importancia médica, como es el caso del transportador Mdr, responsable de la multirresistencia a drogas en tumores humanos.

Cada uno de estos sistemas requiere la presencia de cuatro dominios diferentes asociados a la membrana: dos altamente hidrofóbicos integrales a la membrana y otros dos localizados periféricamente en la cara citoplasmática de la misma que acoplan la hidrólisis de ATP al proceso de transporte. Estos cuatro dominios suelen corresponder a polipéptidos diferentes, aunque en algunos casos se encuentra en un mismo polipéptido más de un dominio.

Cada uno de los dominios hidrofóbicos que compone este tipo de sistemas de transporte posee seis hélices α de expansión de membrana (Hiles *et al.*, 1987), separadas entre sí por cortos segmentos de secuencia hidrofílica. Una de estas secuencias hidrofílicas, denominada lazo EAA (Saurin *et al.*, 1994), está conservada, sino en todas, en la mayoría de estas proteínas (Dassa y Hofnung, 1985) y se encuentra probablemente expuesta a la cara citoplasmática de la membrana, de forma que puede interactuar con los componentes de unión de ATP localizados periféricamente (Mourez *et al.*, 1997).

Los componentes de unión de ATP poseen gran similitud de secuencia entre ellos independientemente del transportador al que pertenezcan, incluso entre bacterias y organismos eucarióticos (Higgins *et al.*, 1985, 1988), por lo que se les conoce como "componentes conservados" (Ames *et al.*, 1990). Estas proteínas poseen una región de unos 200 aminoácidos que contiene dos sitios especialmente conservados que son los lugares de unión del ATP; esta región se denomina región ABC (de "ATP binding

casette"), por lo que a este grupo de permeasas se les conoce con el nombre genérico de transportadores "tipo ABC" (Higgins *et al.*, 1990). La estequiometría del transporte no está muy clara (y podría no ser la misma en todas las permeasas), pero parecen ser dos moléculas de ATP las que se hidrolizan por cada molécula de sustrato transportado. Es probable que la hidrólisis de ATP induzca un cambio conformacional en esta subunidad conservada, que sea transmitido vía interacción proteína-proteína a las subunidades transmembrana que son las que median el paso del soluto a través de la membrana plasmática.

Además de estos cuatro dominios, los transportadores ABC suelen tener una proteína periplásmica de unión de sustrato (Higgins *et al.*, 1990). Estas proteínas periplásmicas tienen alta afinidad por sus sustratos específicos y son los receptores primarios para el transporte (Adams y Oxender, 1989; Quiucho, 1990), encontrándose en exceso con respecto al complejo de membrana. En algunas ocasiones puede existir más de una proteína periplásmica que interaccione con el mismo complejo de membrana. Las proteínas periplásmicas conocidas son variables en tamaño, entre 25 y 59 kDa, encontrándose poca conservación entre sus secuencias primarias, a excepción de los pares de proteínas periplásmicas que interaccionan con un mismo complejo de membrana (Higgins y Ames, 1981). Se ha determinado la estructura tridimensional de algunas proteínas periplásmicas de unión de sustrato y, a pesar de que los distintos sustratos que transportan no están relacionados, se ha visto que sí existe una similitud estructural entre todas ellas (Adams y Oxender, 1989; Quiucho, 1990; Quiucho y Ledvina, 1996).

La unión entre la proteína periplásmica y su correspondiente sustrato es el paso que limita la velocidad del transporte (Miller *et al.*, 1983). Esta unión provoca un cambio conformacional en la proteína de manera que el sustrato queda "atrapado" por ella (Mao *et al.*, 1982; Sack *et al.*, 1989). Este cambio, además, permite a la proteína periplásmica interaccionar con el complejo de membrana, y se piensa que esta interacción no puede ocurrir con la proteína periplásmica libre. Una función adicional de estas proteínas de unión de sustrato es participar en la recuperación de compuestos que se pierden de las células (Stirling *et al.*, 1989; Montesinos *et al.*, 1997).

En las bacterias Gram-positivas, que carecen de membrana externa y por lo tanto de espacio periplásmico, se han identificado proteínas equivalentes a las proteínas periplásmicas de unión de sustrato. Se trata de lipoproteínas que se encuentran ancladas a la membrana plasmática de la célula por su extremo amino y, por ello, sus movimientos se limitan a dos dimensiones (Gilson *et al.*, 1988). En el equivalente eucariótico de este tipo de transportadores falta el elemento periplásmico, al igual que en los sistemas de bacterias que se encargan de exportar solutos más que de importarlos.

1.3.3. Transporte de aminoácidos en cianobacterias

En base a medidas de actividad de transporte utilizando como sustrato aminoácidos marcados radiactivamente y al estudio del fenotipo de mutantes espontáneos aislados como resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos, se ha definido en *Anabaena* sp. PCC 7120 la existencia de al menos cinco sistemas diferentes para el transporte de aminoácidos. Uno activo de alta afinidad para el transporte de aminoácidos básicos, otro pasivo de baja afinidad para el transporte de aminoácidos básicos (Herrero y Flores, 1990), dos sistemas activos de alta afinidad para aminoácidos neutros y un hipotético sistema para el transporte de aminoácidos ácidos (Montesinos *et al.*, 1995). Algunos de estos mutantes de transporte de aminoácidos estaban afectados en el crecimiento diazotrófico y eran incapaces de desarrollar un porcentaje normal de heterocistos en sus filamentos (Montesinos *et al.*, 1995).

En *Anabaena variabilis* se ha descrito la existencia de dos sistemas de transporte para la glutamina y de dos para el glutamato, en ambos casos uno de alta y otro de baja afinidad (Chapman y Meeks, 1983) y se ha aislado un mutante resistente a MSX (análogo tóxico de la metionina y el glutamato) afectado al mismo tiempo en el transporte de alta afinidad de glutamina y de glutamato, lo que sugiere la existencia de algún componente común para el transporte de ambos aminoácidos. Se ha demostrado también la capacidad de esta cianobacteria de transportar leucina mediante un proceso que requiere energía (Thiel, 1988).

En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han descrito mutantes resistentes a la canavanina (un análogo tóxico de la arginina) que están afectados en el transporte activo de los aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina) y parcialmente en el transporte de glutamina, y mutantes resistentes a la azaleucina (análogo tóxico de la leucina) que no están afectados en el transporte de dichos aminoácidos básicos y glutamina pero que carecen de capacidad de transporte de todos los otros aminoácidos excepto el glutamato (Labarre *et al.*, 1987). También se ha revelado la existencia de elementos comunes para el transporte de arginina, lisina y glutamina, habiéndose sugerido que el sistema de transporte de estos aminoácidos podría ser de tipo multicomponente (Flores y Muro-Pastor, 1990). Es de destacar el hecho de que la actividad encontrada de transporte de aminoácidos básicos en la estirpe PCC 6803 sea más alta que cualquiera de las otras actividades de transporte de aminoácidos conocidas en cianobacterias.

En base a estos datos, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito un sistema de transporte para todos los aminoácidos neutros excepto la glutamina (Labarre *et al.*, 1987), y recientemente se ha establecido que este sistema, denominado Nat (de "nneutral amino acid transport"), es del tipo ABC (Montesinos *et al.*, 1997), habiéndose

clonado y caracterizado los genes *natA* y *natB* que determinan respectivamente una proteína de unión de ATP ("componente conservado") y una proteína periplásmica pertenecientes a este sistema. En *Anabaena* sp. PCC 7120, además del gen *natA*, se ha caracterizado el gen *natC* que determina una proteína hidrofóbica de membrana del mismo sistema de transporte (Montesinos, 1997).

En general, los estudios llevados a cabo hasta ahora han permitido deducir que las cianobacterias portan un número relativamente reducido de transportadores de aminoácidos cada uno de los cuales muestra una baja especificidad de sustrato, siendo capaces de transportar grupos de aminoácidos más que aminoácidos individuales.

1.4. CATABOLISMO DE ARGININA Y PROLINA

1.4.1. Catabolismo de arginina

Las bacterias utilizan varias estrategias distintas para degradar la arginina (Cunin *et al.*, 1986). Entre ellas las rutas más comunes son dos: la ruta de la arginasa y la ruta de la arginina deiminasa.

La degradación de la arginina por la vía de la arginasa produce ornitina y urea. La utilización de dicha ornitina como fuente de carbono y nitrógeno conlleva su metabolización hasta glutamato por la acción secuencial bien de la ornitina transaminasa (que produce glutamato semialdehído, el cual se deshidrata y cicla espontáneamente para dar Δ^1 pirrolina-5-carboxilato) y la Δ^1 pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, como ocurre en algunas estirpes de *Bacillus*, o bien de la ornitina ciclodeaminasa (que produce prolina) y la prolina oxidasa, como ocurre en algunas estirpes de *Agrobacterium* (Figura 1). La urea se degrada en la mayoría de los organismos mediante la enzima ureasa, liberándose en la reacción dos moléculas de amonio y una de CO₂ por cada molécula de urea hidrolizada. La ureasa cianobacteriana es, como la de otras bacterias, una enzima multimérica dependiente de Ni²⁺ compuesta por tres subunidades diferentes (Jahns *et al.*, 1995). Los genes estructurales de la ureasa, *ureA*, *ureB* y *ureC*, se han identificado en una cianobacteria marina del género *Synechococcus* (Collier *et al.*, 1999) y se encuentran también en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996).

Por otro lado, mediante la vía de la arginina deiminasa, la arginina se metaboliza rindiendo citrulina y amonio. La citrulina a su vez es catabolizada a ornitina y carbamilsulfato por acción de la ornitina transcarbamilasa catabólica, y el carbamilsulfato producido es después metabolizado por la carbamato quinasa generándose ATP, bicarbonato y amonio. La utilización de arginina por la vía de la arginina deiminasa provoca en muchas bacterias una abundante excreción de ornitina

(Cunin *et al.*, 1986). De hecho, algunas bacterias incorporan arginina en las células por medio de un sistema de antiporte arginina-ornitina (Driessen *et al.*, 1987), el producto del gen *arcD* en *Pseudomonas aeruginosa* (Lüthi *et al.*, 1990).

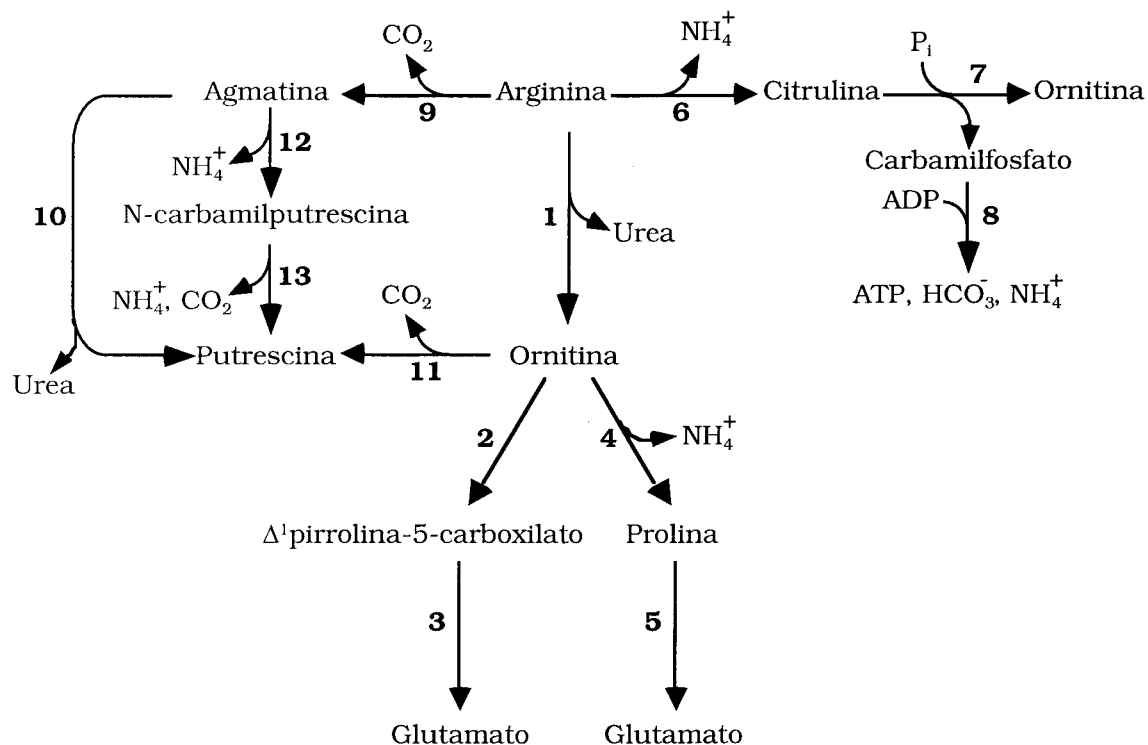


Figura 1. Algunas rutas de degradación de arginina comunes en bacterias.

1, arginasa; **2**, ornitina transaminasa; **3**, Δ^1 pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; **4**, ornitina ciclodeaminasa; **5**, prolina oxidasa; **6**, arginina deiminasa; **7**, ornitina transcarbamilasa; **8**, carbamato quinasa; **9**, arginina descarboxilasa; **10**, agmatinasa; **11**, ornitina descarboxilasa; **12**, agmatina deiminasa; **13**, N-carbamilputrescina hidrolasa. La reacción 2 es una transaminación que utiliza α -cetoglutarato como aceptor, la 5 es una oxidación que conlleva la reducción de un NAD^+ soluble y de un FAD que se encuentra asociado a la proteína, y la 3 es una oxidación que conlleva la reducción de un NAD^+ .

Otra vía para el catabolismo de arginina encontrada en bacterias es la de descarboxilación con generación de agmatina (Cunin *et al.*, 1986). La agmatina a su vez se degrada a putrescina mediante la agmatinasa o vía carbamilputrescina (Figura 1). La putrescina puede generarse asimismo mediante la descarboxilación de la ornitina.

En algunas bacterias la arginina se cataboliza aún por otra ruta: la de la arginina succiniltransferasa, en la cual la arginina es primero activada a N^2 -succinilarginina que es transformada en N^2 -succinilglutamato a través de una ruta similar a la de la arginasa, para finalmente rendir glutamato (Cunin *et al.*, 1986). La vía de la arginina succiniltransferasa es necesaria para el catabolismo aeróbico de arginina en *E. coli* y al menos una de las enzimas de esta vía (la succinilornitina aminotransferasa) contribuye al catabolismo de ornitina (Schneider *et al.*, 1998). La limitación de nitrógeno induce esta vía en *E. coli* y en *Klebsiella aerogenes*.

1.4.2. Catabolismo de prolina

Algunas bacterias, como por ejemplo *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, pueden utilizar prolina como única fuente de carbono y nitrógeno. Esta utilización de prolina requiere las actividades de dos proteínas independientes codificadas por el operón *put*: PutP, que es una permeasa que media el transporte activo de prolina mediante un simporte con Na^+ (Cairney *et al.*, 1984), y PutA. PutA es una proteína periférica de membrana multifuncional que actúa como represor transcripcional del operón *put* y que cataliza los dos pasos de transformación de prolina en glutamato (Muro-Pastor y Maloy, 1995). La primera reacción enzimática catalizada por PutA es la oxidación de la prolina a Δ^1 pirrolina-5-carboxilato (P5C) y está acoplada a la reducción de un flavín adenosín dinucleótido (FAD) que actúa como cofactor y está fuertemente asociado a la proteína. Durante esta reacción, PutA debe interactuar con la cadena de transporte de electrones asociada a la membrana para la reoxidación del FAD reducido. La segunda reacción, la oxidación de la Δ^1 pirrolina-5-carboxilato a glutamato, está acoplada a la reducción de NAD^+ soluble. Ciertos ensayos cinéticos han indicado que en presencia de NAD^+ las dos reacciones enzimáticas asociadas con la proteína PutA funcionan sincrónicamente (Surber y Maloy, 1998).

1.4.3. Catabolismo de aminoácidos en cianobacterias

El metabolismo de la arginina en cianobacterias es de particular interés, al ser este aminoácido, como se describió en el apartado 1.2, uno de los componentes de los gránulos de cianoficina.

La actividad arginasa ha sido descrita en distintas cianobacterias incluyendo estirpes de *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* (*Synechocystis*) sp., *Nostoc* sp. y *Oscillatoria* sp. (Hood y Carr, 1971; Weathers *et al.*, 1978; Bednarz y Schmid, 1991; Martel *et al.*, 1993; Singh y Bisen, 1994). También la actividad arginina deiminasa se ha detectado en algunas estirpes de *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* (*Synechocystis*) sp. y *Nostoc* sp. (Hood y Carr, 1971; Weathers *et al.*, 1978; Martel *et al.*, 1993). En algunos organismos, como en *Aphanocapsa* sp. PCC 6308, se ha sugerido que coexisten las dos rutas. En este caso, la ruta de la arginasa proporcionaría a las células nitrógeno mientras que la ruta de la arginina deiminasa proporcionaría, además de nitrógeno, CO_2 y ATP (Weathers *et al.*, 1978). En *Anabaena variabilis* se ha detectado un aumento de sólo un 20% tanto de la actividad arginasa como de la arginina deiminasa cuando el medio de cultivo se suplementa con arginina (Hood y Carr, 1971). En *Nostoc* sp. PCC 73102, sin embargo, se ha descrito que la adición de arginina, ornitina y, en menor medida, citrulina a los cultivos aumentan substancialmente las actividades arginasa, ornitina transcarbamilasa

y arginina deiminasa medidas *in vitro* (Martel *et al.*, 1993). Un resultado similar se ha obtenido en la cianobacteria filamentosa *Oscillatoria chalybea*, en la que la presencia en el medio de cultivo de arginina, ornitina o citrulina induce la actividad arginasa (Bednarz y Schmid, 1991). Ha de aclararse, sin embargo, que las actividades arginasa y arginina deiminasa descritas en cianobacterias son en general muy bajas, no habiéndose purificado ninguna de estas enzimas ni identificado ninguno de los genes correspondientes.

Las cianobacterias unicelulares *Synechococcus* sp. PCC 6301 y 7942 expresan una L-aminoácido oxidasa, el producto del gen *aoxA*, que libera α -cetoarginina y amonio a partir de la arginina (Bockholt *et al.*, 1995; Bockholt *et al.*, 1996). Esta aminoácido oxidasa se localiza fundamentalmente en el espacio periplásmico (Bockholt *et al.*, 1996) y muestra una baja afinidad por sus sustratos (Flores *et al.*, 1982).

Poco se conoce del metabolismo de la prolina en las cianobacterias. En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha demostrado que la prolina suministrada externamente se oxida a una velocidad suficiente como para apoyar el crecimiento. Se ha sugerido que la prolina reprime la diferenciación de heterocistos e inhibe la fijación de nitrógeno sin afectar a la tasa de crecimiento de dicha estirpe (Spence y Stewart, 1986).

1.5. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

En este trabajo se han planteado como objetivos la identificación de ORFs del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 implicadas en el transporte de aminoácidos y en el catabolismo de la arginina, así como el estudio de estos procesos. Ello nos ha llevado también al estudio del catabolismo de la prolina.

Los resultados recogidos en esta memoria se han publicado ya o se encuentran en preparación para su publicación:

Quintero M.J., Muro-Pastor A.M., Herrero A. y Flores E. (2000) Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. *J. Bacteriol.* **182**: 1008-1015.

Quintero M.J., Herrero A. y Flores E. Identification of genes encoding the Nat (neutral amino acid) and Bgt (basic amino acid and glutamine) transporters of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. (en preparación)

Quintero M.J., Montesinos M.L., Herrero A. y Flores E. (2000) Identification of the genes encoding two Na⁺-dependent glutamate transporters in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. (en preparación)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. Estirpe empleada

La cianobacteria en la que se ha centrado el presente trabajo es *Synechocystis* sp. PCC 6803, unicelular heterótrofa facultativa perteneciente a la Sección I de la clasificación taxonómica propuesta por Rippka *et al.* (1979).

2.1.1.2. Condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en condiciones axénicas empleando el medio BG110 (Rippka *et al.*, 1979) que consta de los siguientes componentes: Na_2CO_3 0,2 mM, MgSO_4 0,3 mM, CaCl_2 0,24 mM, K_2HPO_4 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM , citrato férrico amónico (17% Fe) 6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2,4 μM , H_3BO_3 46 μM , MnCl_2 9,1 μM , Na_2MoO_4 1,6 μM , ZnSO_4 0,8 μM , CuSO_4 0,3 μM y CoCl_2 0,2 μM . Los medios de cultivo se preparaban a partir de un concentrado (100x) que contenía todos los componentes excepto el K_2HPO_4 , que se añadía antes de esterilizar el medio. Como fuente de nitrógeno se utilizaba NaNO_3 a concentración 17,6 mM (denominándose el medio BG11). Opcionalmente los medios BG11 y BG110 se suplementaban con 0,84 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaHCO_3 , denominándose entonces BG11C y BG110C, respectivamente.

El cultivo en medio líquido se llevaba a cabo en matraces Erlenmeyers de 250 ó 100 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio o en matraces de 50 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio. Independientemente del volumen del matraz empleado, se incubaba a 30°C con luz blanca (75 $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y agitación continua (80-90 rpm) en agitadores orbitales. En aquellos casos en los que se necesitaba burbujear el medio líquido, se utilizaba para este fin una mezcla (1,5% v/v) de CO_2 y aire estéril.

Para la preparación de medios sólidos se utilizaba agar Difco al 1% (p/v) esterilizado en autoclave por separado.

Cuando se utilizaba algún aminoácido como fuente de nitrógeno, como la arginina o la prolina, se hacía a concentración final 5 mM y dicho aminoácido se esterilizaba por filtración antes de añadirse al medio de cultivo.

Para cultivar los mutantes auxótrofos de algún aminoácido, se suplementaba el medio de cultivo con el aminoácido en cuestión, a concentración final 1 mM, también esterilizado por filtración.

Para cultivar los mutantes resistentes a antibióticos, el medio se suplementaba con el antibiótico apropiado esterilizado mediante filtración, utilizándose las siguientes concentraciones: kanamicina (Km) 25-300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; cloranfenicol (Cm) 10-80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.1.1.3. Curvas de crecimiento

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

La constante específica de crecimiento, μ , se define como $\ln 2/t_d$, donde t_d es el tiempo de duplicación o generación.

2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. Estirpes empleadas

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo, así como las características más relevantes de su genotipo se detallan en la Tabla 1.

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

Estirpe	Genotipo	Referencia o fuente
DH5 α	F- <i>supE44 hsdR17 (r_K-m_K-)recA1 girA96 endA1 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF) (\emptyset80lacZ ΔM15)U169</i>	Hanahan, 1983
HB101	F- <i>hsdS20(r_B-m_B-) leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
GM48	<i>Thr-1 leuB6 thi-1 lacY galK2 galT22 ara14 fhuA tsx dam3 dcm3 supE44</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985

2.1.2.2. Condiciones de cultivo

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

Para la preparación de células competentes se utilizaba el medio Ψ (Sambrook *et al.*, 1989) que está compuesto por: Bactotripton 20 g·l⁻¹, extracto de levadura 5 g·l⁻¹, MgSO₄ 4 g·l⁻¹ y KCl 10 mM.

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

Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) 50-100 µg·ml⁻¹; kanamicina 50 µg·ml⁻¹; cloranfenicol 25 µg·ml⁻¹; estreptomycin (Sm) 25 µg·ml⁻¹; espectinomicina (Sp) 100 µg·ml⁻¹. Los antibióticos se esterilizaban por filtración.

2.1.3. Métodos de recogida y lavado de células

Las células de los cultivos de cianobacterias se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga Heraeus modelo "Megafuge 1.0", a 3020 x *g* durante 5-10 minutos. Cuando el experimento requería el lavado de las células, éstas se resuspendían en el medio o tampón adecuado y se centrifugaban, repitiéndose el proceso al menos tres veces.

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

2.2. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

Células cultivadas en medio líquido BG11, suplementado con el antibiótico correspondiente en el caso de los mutantes, se recogían y lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), como se indica en el apartado 2.1.3, y se resuspendían en el

mismo tampón. En los casos en los que se determinaba el efecto del Na⁺ en el transporte se utilizó tampón Tricina-KOH 25 mM (pH 8,1). Los ensayos se llevaban a cabo a 30°C, en tubos situados en un baño de paredes transparentes para permitir la iluminación de los mismos con luz blanca procedente de lámparas fluorescentes (180-190 $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El ensayo se iniciaba mezclando 1 ml de suspensión celular (conteniendo 4-10 μg Chl) con una disolución (0,1 ml) en tampón Tricina del aminoácido cuyo transporte se iba a estudiar (en los casos en los que se determinaba el efecto del Na⁺ en el transporte, las células se suplementaban con NaCl, a las concentraciones que se indican en cada experimento, 1 min antes de añadir el aminoácido). Los aminoácidos utilizados como sustrato fueron L-[U-¹⁴C]aminoácidos (4,5-70 $\mu\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$), a la concentración indicada en cada caso. El volumen total de reacción era 1,1 ml. Tras un tiempo de incubación de 10 min (a menos que se indique otra cosa), se tomaba una muestra de 1 ml que se filtraba a través de un filtro Millipore HA de 0,45 μm de diámetro de poro y se lavaba con 5-10 ml de tampón Tricina. Los filtros se introducían en viales a los que se añadían 5 ml de líquido de centelleo (Ready Protein⁺, Beckman), determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo "LS6000IC". Como blanco se utilizaba la radiactividad retenida por una suspensión de células hervidas procesada de la misma manera. Los resultados se presentan como la media de los obtenidos en las determinaciones independientes llevadas a cabo e indicadas en cada caso. Por simplificar no se presenta la desviación típica de la media, que era generalmente menor que el 30% del valor de ésta.

2.3. ENSAYO DE CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Células cultivadas en medio BG11 (suplementado con aminoácidos y/o antibióticos cuando se indica) se recogían por centrifugación a temperatura ambiente, se lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), como se describió en el apartado 2.1.3, y se resuspendían en un pequeño volumen del mismo tampón. La reacción se iniciaba cuando una suspensión celular (1,1 ml) preparada de esta manera, conteniendo 6-16 μg Chl, se mezclaba con una disolución (0,1 ml) en tampón Tricina del aminoácido cuyo catabolismo se iba a ensayar. Los ensayos se llevaban a cabo a 30°C, durante 15 min y con iluminación (luz blanca procedente de lámparas fluorescentes, 180-190 $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Los aminoácidos utilizados como sustrato (arginina, ornitina o prolina) eran L-[U-¹⁴C]aminoácidos (10-25 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$), a una concentración final en el ensayo de 1-2 μM . Transcurridos 15 min de incubación, las células contenidas en 1 ml de muestra se recogían mediante filtración (filtro Millipore HA de 0,45 μm de diámetro de poro) y se lavaban con 5-10 ml de tampón Tricina. Los filtros con las células se introducían en tubos que contenían 2 ml de agua hirviendo y se

incubaban a 100°C durante 5 min. Tras ese tiempo se sacaba el filtro (ya sin células) que se descartaba, y los tubos se centrifugaban (1377 x g, 5 min) a temperatura ambiente para sedimentar los restos celulares. Muestras de 1,5 ml de los sobrenadantes obtenidos se congelaban y liofilizaban, resuspendiéndose después en 20 µl de agua.

2.4. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Para analizar los metabolitos marcados generados mediante el catabolismo de un aminoácido, se aplicaban alícuotas de las muestras preparadas como se indica en el apartado anterior en placas de capa fina (0,1 mm) de celulosa de 20x20 cm (Merck), en las que se sometían a una separación bidimensional, haciendo uso de uno de los dos sistemas de solventes que se describen a continuación. En el primer sistema (sistema de solventes I) el solvente utilizado en la primera dimensión era *n*-butanol-acetona-hidróxido amónico-agua (20:20:10:4, v/v) y en la segunda dimensión isopropanol-ácido fórmico-agua (20:1:5, v/v). En el segundo sistema de solventes (sistema de solventes II), el utilizado en la primera dimensión era fenol-agua (100:28, v/v) y en la segunda *n*-butanol-ácido acético-agua (12:3:5, v/v). Las placas de TLC se analizaban mediante autorradiografía electrónica utilizando un contador bidimensional de radiación β (InstantImager, Packard), el cual permitía un análisis cuantitativo de las manchas radiactivas. La eficiencia del InstantImager en la detección de las partículas β del ¹⁴C es de aproximadamente un 1,12%. La identificación de los metabolitos responsables de las manchas radiactivas se hacía mediante co-cromatografía, suplementando las muestras radiactivas con aminoácidos no marcados y revelando los mismos tras la cromatografía con una disolución de ninhidrina. La disolución de ninhidrina se preparaba disolviendo 500 mg de ninhidrina en 50 ml de acetona y añadiendo una disolución de 50 mg de acetato de cadmio en una mezcla de 5 ml de agua y 1 ml de ácido acético glacial (Atfield y Morris, 1961).

2.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.5.1. Ensayos de actividad ornitina transcarbamilasa

La actividad ornitina transcarbamilasa se determinaba en células permeabilizadas mediante la detección colorimétrica de citrulina utilizando 2,3-butanodiona monoxima (Boyde y Rahmatullah, 1980).

Las células que se habían cultivado en medio BG11, con o sin aminoácidos añadidos, se recogían por centrifugación y se lavaban con tampón Tricina-NaOH 200

mM (pH 8,1), como se describió en el apartado 2.1.3, y se resuspendían en el mismo tampón, obteniéndose una concentración de clorofila de 80-200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía en un volumen de 0,460 ml : tampón Tricina-NaOH 200 mM (pH 8,1), carbamil fosfato 10 mM, L-ornitina 10 mM, una cantidad de células conteniendo 20-50 μg Chl y detergente MTA (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}$ Chl⁻¹). La reacción se iniciaba mediante la adición de ornitina y se llevaba a cabo a 30°C. Tras diferentes tiempos de incubación, entre 10 y 40 min, se tomaban muestras de 0,1 ml que se mezclaban con 50 μl de TCA 21%, se incubaban a 4°C durante 15 min y se centrifugaban 5 min a 4°C en tubos de microcentrífuga. Muestras de 100 μl del sobrenadante se empleaban para la determinación colorimétrica de la citrulina producida en la reacción. El coeficiente de extinción empleado era $E=0,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de citrulina $\cdot\text{min}^{-1}$.

2.5.2. Ensayos de actividad arginasa en células permeabilizadas

La actividad arginasa se determinaba según el método descrito por Ratner (1962). Para ello se partía de cultivos en medio BG11₀ con arginina añadida como fuente de nitrógeno a una concentración final de 5 mM. Las células de los mismos se recogían por centrifugación y se lavaban con tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 8,5), como se describió en el apartado 2.1.3, y se resuspendían en el mismo tampón. Esta suspensión celular, que contenía 100-250 μg Chl $\cdot\text{ml}^{-1}$, se trataba con tolueno (0,5 ml $\cdot\text{mg}$ Chl⁻¹) con agitación vigorosa durante 1 min, tras lo cual se centrifugaba 5 min a temperatura ambiente. Se desechaba el sobrenadante para eliminar los restos de tolueno y el sedimento se resuspendía en un pequeño volumen de tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 8,5). La mezcla de reacción contenía en un volumen de 3 ml: tampón Tricina-NaOH 500 mM (pH 8,5), L-arginina 20 mM y una cantidad de células que contenía 130-325 μg Chl. (La arginasa es una enzima dependiente de manganeso. Sin embargo, nosotros no observamos incremento de la actividad por adición de MnCl_2 .) La reacción se iniciaba en el momento en el que se añadían las células y se llevaba a cabo a 30°C. Tras tiempos de incubación entre 15 y 60 min se tomaban muestras de 0,5 ml que se mezclaban con 20 μl de ácido sulfúrico, se centrifugaban en una centrifuga Eppendorf a 4°C durante 10 min y 0,250 ml del sobrenadante obtenido se utilizaban para la determinación colorimétrica de ornitina (Ratner, 1962). El coeficiente de extinción empleado era $E=4,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de ornitina $\cdot\text{min}^{-1}$.

2.5.3. Ensayos de actividad arginasa y agmatinasa en extractos crudos

2.5.3.1. Obtención y preparación de las muestras

Se partía de células que habían sido cultivadas en medio BG11₀ con arginina 5 mM como fuente de nitrógeno, y con antibióticos añadidos en el caso de los mutantes, gaseadas con CO₂ y aire estéril. Las células se recogían mediante centrifugación en rotores GSA (5000 rpm, 5 min, 4°C) y se lavaban con tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 8,5) en las mismas condiciones. Finalmente se resuspendían en 20 ml del mismo tampón suplementado con 1 mM de los inhibidores de proteasas PMSF, ácido aminocaproico y benzamidina, 1-3 mg de DNasa I (Boehringer) y DTT 1 mM.

La rotura celular se llevaba a cabo en una Prensa de French, en un cilindro de la prensa preenfriado a 4°C, a una presión de 20000 psi. Para aumentar la eficiencia de la rotura se repetía al menos una vez el pase por la prensa en las mismas condiciones. Los restos celulares se eliminaban por centrifugación (10000 rpm, 20 min, 4°C) en un rotor SS34, conservándose el sobrenadante para la determinación enzimática.

2.5.3.2. Actividad arginasa

La mezcla de reacción para determinar la actividad arginasa contenía en un volumen de 1,5 ml: un muestra de extracto conteniendo 4-6 mg de proteína, tampón Tricina-NaOH 500 mM (pH 8,5) y L-arginina 20 mM. La reacción se llevaba a cabo del mismo modo descrito en el apartado 2.5.2.

2.5.3.3. Actividad agmatinasa

Para la medida de la actividad agmatinasa, se suplementaban los extractos celulares con agmatina, sustrato de la reacción, y, tras distintos tiempos de incubación, se estimaba la cantidad de urea producida (Morris y Pardee, 1966). Debido a que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 existe una alta actividad ureasa (Valladares *et al.*, 1995), ésta debía ser inhibida para permitir la determinación de la urea. Para ello se añadía a los extractos ácido acetohidroxámico, a una concentración final de 5 mM, que es un potente inhibidor de la actividad ureasa (Kobashi *et al.*, 1971). Las muestras se incubaban en un baño a 30°C durante 30 min, tras lo cual se determinaba la actividad ureasa para comprobar que efectivamente se había producido una inhibición de dicha actividad.

La mezcla de reacción para determinar la ureasa contenía en un volumen de 0,5 ml: un muestra de extracto conteniendo 300-400 µg de proteína, tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 8,5) y urea 25 mM. Tras 30 min de incubación a 30°C, la mezcla de reacción se centrifugaba durante 5 min a 4°C en un tubo de microcentrifuga, y el amonio producido se determinaba añadiendo a un volumen de 0,1 ml del sobrenadante obtenido 0,9 ml de agua y 0,5 ml de un reactivo comercial ("Sigma ammonia color reagent") que contiene una sal doble de iodo y mercurio, midiéndose a continuación la absorbancia del compuesto coloreado formado a 430 nm. Como blanco se realizaban ensayos paralelos que contenían agua en lugar de urea. Para la determinación de la cantidad de amonio se realizaba una curva patrón con concentraciones conocidas de NH₄Cl.

La actividad agmatinasa se determinaba mediante la detección colorimétrica de urea, utilizando 2,3-butanodiona monoxima (Boyde y Rahmatullah, 1980). La mezcla de reacción contenía en un volumen de 0,950 ml: una muestra del extracto tratado con ácido acetohidroxámico conteniendo 4-6 mg de proteína, tampón Tricina-NaOH 500 mM (pH 8,5), MnCl₂ 1 mM y agmatina 8 mM. La reacción se llevaba a cabo a 30°C y tras diferentes tiempos de incubación, entre 15 y 105 min, se tomaban muestras de 0,1 ml que se mezclaban con ácido perclórico a una concentración final del 5 %. Se incubaba a 4°C durante 5-10 min y se centrifugaban las muestras en tubos de microcentrifuga durante 5 min a 4°C. Muestras de 0,1 ml del sobrenadante se empleaban para determinar colorimétricamente la urea producida durante la reacción. El coeficiente de extinción empleado era $E=0,55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de urea·min⁻¹.

2.6. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES

2.6.1. Determinación de clorofila

El contenido en clorofila *a* (Chl) de las suspensiones celulares de cianobacterias se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos de las células (Mackinney, 1941). Un volumen de suspensión celular no superior a 0,1 ml, conteniendo un máximo de 60 µg de Chl, se mezclaba con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrifuga, se agitaba vigorosamente y la suspensión resultante se centrifugaba a 10000 x *g*, 2 min a temperatura ambiente. La concentración de clorofila en el sobrenadante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un coeficiente de extinción $E=74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.6.2. Determinación de proteína

La cantidad de proteína total de las suspensiones celulares o de los extractos crudos se determinaba siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). Muestras de 200 μ l se mezclaban con 50 μ l de NaOH 0,5 N y 750 μ l de una mezcla (en proporción 100:1) de las disoluciones A y B, cuyas composiciones se especifican a continuación. Disolución A: Na₂CO₃ 2% (p/v); NaOH 0,4% (p/v); tartrato sódico-potásico 0,16% (p/v) y SDS 1% (p/v). Disolución B: CuSO₄·5H₂O 4% (p/v). Tras agitación e incubación durante 15 min a 30°C, se añadían 75 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido en agua (1:1 v/v), se agitaba y se incubaba de nuevo durante 30 min a 30°C. A continuación se medía la absorbancia a 750 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

2.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA

2.7.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo, no construidos durante la realización del mismo, se relacionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia o fuente
pGEM-T	Vector (Ap ^r) para la clonación de productos generados mediante PCR	Promega
pBluescript SK(+)	Vector (Ap ^r) de clonación	Stratagene
pIC20R	Vector (Ap ^r) de clonación	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pRL139	Vector (Ap ^r) de clonación	Elhai y Wolk, 1988
pRL171	Vector (Ap ^r Cm ^r) de selección positiva que contiene la casete de resistencia a Cm C.C1	Elhai y Wolk, 1988
pRL278	Vector (Km ^r) de selección positiva que contiene la casete de resistencia a Km C.K3	Cai y Wolk, 1990
pRL446	Vector (Km ^r) de selección positiva que contiene la casete de resistencia a Km C.K2	Elhai y Wolk, 1988
pRL500	Vector (Ap ^r) de clonación	Elhai y Wolk, 1988

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

Se utilizaba uno de los dos procedimientos de aislamiento siguientes:

2.7.2.1. Lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989)

Las células contenidas en 3 ml de cultivo se recogían mediante centrifugación (13000 x *g*, 1 min, temperatura ambiente) en tubos de microcentrifuga y se resuspendían en 100 µl de Disolución I (Tris-HCl 25 mM [pH 8,0]; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM [pH 8,0]). A continuación se añadían 200 µl de Disolución II (NaOH 0,2 N; SDS 1% [p/v]) y se agitaba brevemente, produciéndose así la lisis celular. Se añadían entonces 150 µl de Disolución III (acetato potásico 5 M [pH 4,8]), se homogeneizaba agitando suavemente, se incubaba en hielo durante 5 min y se centrifugaba (13000 x *g*, 5 min, 4°C). El sobrenadante obtenido se transfería a un tubo limpio y se sometía a una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1 v/v), separándose las fases mediante centrifugación. La fase acuosa se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba y se resuspendía en 20-25 µl de tampón T1/10E (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0]; EDTA 0,1 mM [pH 8]).

2.7.2.2. Procedimiento de Holmes y Quigley (1981)

Las células contenidas en 3 ml de cultivo se recogían por centrifugación (13000 x *g*, 1 min, temperatura ambiente) en tubos de microcentrifuga y se resuspendían en 350 µl de tampón STET (sacarosa 8% [p/v]; Tris-HCl 10 mM; EDTA 50 mM; Tritón X-100 0,5% [v/v, pH 8,0]). La suspensión resultante se suplementaba con 25 µl de lisozima (10 mg·ml⁻¹ en Tris-HCl 1 M [pH 8]), se agitaba suavemente y se incubaba en agua hirviendo durante 40 s. Posteriormente se centrifugaba (13000 x *g*, 20 min, 4°C). El precipitado gelatinoso formado se eliminaba con un palillo esterilizado, y los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante se precipitaban mediante la adición de 350 µl de isopropanol, incubación durante 15 min a temperatura ambiente y centrifugación (13000 x *g*, 15 min, temperatura ambiente). El precipitado obtenido se secaba y se resuspendía en 20-25 µl de tampón T1/10E.

2.7.3. Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a escala mediana

Para el aislamiento de plásmidos cuando el volumen de partida era de 30 o de 100 ml (según el plásmido fuera de alto o de bajo número de copias), se procedía usando

el juego de reactivos "DNA midiprep" de Quiagen según las indicaciones del fabricante. El DNA obtenido se resuspendía en 100-200 μ l de agua.

2.7.4. Aislamiento de DNA total de *Synechocystis* sp.

El aislamiento de DNA total de *Synechocystis* sp. se realizaba siguiendo el método descrito por Cai y Wolk (1990). Las células de un cultivo de 50 ml se recogían por centrifugación y se resuspendían en 400 μ l de T1/10E. A esta suspensión celular se añadían 150 μ l de perlas de vidrio (0,25-0,3 mm de diámetro; previamente lavadas con ácido nítrico y agua y esterilizadas a 180°C), 20 μ l de SDS al 10% (p/v) y 450 μ l de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo. La mezcla resultante se sometía a 5-10 ciclos de agitación con vórtex (1 min) e incubación en hielo (1 min), tras lo cual se centrifugaba (12000 x g, 15 min, 4°C) y el sobrenadante obtenido se sometía a extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1 (v/v), dos veces, y, finalmente, 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa final se precipitaba con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol absoluto mediante incubación a -70°C durante 30 min y posterior centrifugado (12000 x g, 15 min, 4°C). El precipitado resultante se lavaba con etanol al 70% (v/v) y se secaba al aire durante 45-60 min. Finalmente, el DNA precipitado se resuspendía en 30-50 μ l de tampón T1/10E.

2.7.5. Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA en disolución se determinaba sometiendo una muestra de la misma a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio, tal como se explica en el apartado 2.7.6. Terminada la electroforesis, se comparaba la intensidad de la banda obtenida con las de patrones de DNA digerido del fago λ que se resolvían simultáneamente en el mismo gel.

En algunos casos también se hacía una determinación espectrofotométrica de la concentración de DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se medía la absorbancia de la muestra a 260 nm en cubetas de cuarzo de 0,5 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz. El coeficiente de extinción empleado era $E=0,02$ (mg/ml) $^{-1}\cdot$ cm $^{-1}$.

2.7.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles de agarosa se preparaban en tampón TBE 0,5x. El tampón TBE 1x consistía en: Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM (pH 8,0). La concentración de agarosa de los geles variaba entre el 0,6% y el

1,2% (p/v), dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos que se quisiera resolver. Las muestras se trataban con RNasa (concentración final 0,05 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) antes de ser sometidas a electroforesis y se suplementaban con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10x compuesto por: glicerol 50% (v/v), azul de bromofenol 0,4% (p/v) y xilencianol FF 0,4% (p/v). Como patrones de tamaño se utilizaban los fragmentos resultantes de la digestión del DNA del fago λ con la enzima de restricción *Cla*I. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales modelos GNA-100 o GNA-200 (Pharmacia). Para la detección del DNA se añadía a los geles de agarosa bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El DNA se visualizaba iluminando los geles con un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se fotografiaba utilizando un equipo formado por una cámara de video (UVP), un monitor (Sony), una impresora videográfica (Sony) y una unidad ImageStore 5000 (UVP).

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

Los fragmentos de DNA separados por electroforesis se extraían de los geles de agarosa mediante el uso del juego de reactivos "GeneClean II" (BIO 101 Inc., USA) usado según las instrucciones del fabricante. La extracción mediante este procedimiento se basa en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI 6 M y en la unión del DNA a perlas de vidrio.

Para el aislamiento de fragmentos de DNA menores de 500 pb, se utilizaban membranas de DEAE-celulosa (NA 45, Schleicher & Schuell) tratadas previamente con NaCl 2,5 M durante varias horas y lavadas abundantemente con H₂O. El fragmento de DNA se asociaba a la membrana mediante electroforesis, de la cual se eluía calentando la membrana a 68°C durante 30 min en 400 μl de disolución de elución que consistía en: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0) y NaCl 1 M. El DNA eluido se precipitaba con 4 μl de MgCl₂ 1 M y 1 ml de etanol absoluto, se secaba y se resuspendía en 10-20 μl de T1/10E.

2.7.8. Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministradas por las firmas comerciales Boehringer Mannheim, New England BioLabs y Pharmacia, y se utilizaban según las recomendaciones de los fabricantes. En el caso de restricciones dobles o triples se usaba aquel tampón con el que todas las enzimas tuviesen la mayor actividad posible. Si no había una opción adecuada, las restricciones se realizaban secuencialmente, cambiando el tampón tras cada una de ellas. Para ello, se filtraba la muestra a través de una columna de Sephadex-G50. La columna se

montaba en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml en cuya base se había perforado un pequeño orificio que se cubría con un lecho de perlas de vidrio de 0,3 μm de diámetro y sobre el que se asentaban 700-900 μl de la matriz equilibrada en tampón TE (5 g de Sephadex-G50 en 75 ml de TE [pH 8,0]). La columna así preparada se encajaba en un segundo tubo en el que se recogía el eluyente de la misma.

La columna se centrifugaba (3000 x g, 2-3 min, temperatura ambiente), tras lo cual el tubo inferior se cambiaba por otro limpio, se aplicaba la muestra sobre la matriz dispuesta en el tubo superior y se centrifugaba de nuevo (3000 x g, 3 min, temperatura ambiente). El eluyente de esta segunda centrifugación consistía en una disolución de DNA en el tampón T1/10E, pH 8,0.

2.7.9. Desfosforilación del DNA

En algunos casos, con el fin de evitar la religación del vector y, por lo tanto, la generación de un alto número de plásmidos sin inserto cuando se intentaba clonar un fragmento de DNA no seleccionable, los grupos fosfato de los extremos 5' del vector se eliminaban mediante desfosforilación.

Una vez digerido el vector con las enzimas de restricción adecuadas, éstas se inactivaban calentando la mezcla de reacción 15 min a 70°C, después de lo cual se suplementaba con 0,1 volúmenes de un tampón de reacción 10x que consistía en: Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), ZnCl₂ 10 mM y MgCl₂ 10 mM. Se añadía entonces 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Pharmacia) y, tras 30 min de incubación a 37°C, se añadía otra unidad de enzima y se continuaba la incubación durante otros 30 min. Finalmente, la preparación obtenida se sometía a electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento de DNA deseado se purificaba como se describe en el apartado 2.7.7.

2.7.10. Relleno de extremos 5' protuberantes

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

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

2.7.11. Ligación de DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA, éstos se mezclaban en un tubo de microcentrífuga en presencia de 3 U de DNA ligasa del fago T4 (Promega), en el tampón suministrado por la casa comercial. La mezcla resultante, en un volumen final de 10-15 μ l, se incubaba a 15°C durante 4-16 h.

2.7.12. Marcaje radiactivo de sondas de DNA

Para el marcaje radiactivo de sondas de DNA se seguía el procedimiento de "random primer" utilizando el juego de reactivos "Ready To Go" (Pharmacia), que suministra una mezcla de reacción liofilizada conteniendo dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa y una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. El DNA a marcar (25-100 ng), desnaturalizado mediante incubación a 100°C (10 min) e inmediato enfriamiento en hielo (3 min), se añadía a la mezcla anterior resuspendida en agua, en presencia de [α -³²P]dCTP (3000 Ci·mmol⁻¹). A continuación se incubaba durante 30 min a 37°C. Tras el marcaje, los nucleótidos no incorporados se eliminaban filtrando la muestra a través de una columna de Sephadex G-50.

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

Una vez sometidas las muestras de DNA a electroforesis en un gel de agarosa, éste se sumergía en HCl 0,25 N durante 10-15 min para hidrolizar parcialmente el DNA y facilitar así su transferencia, se lavaba con agua y a continuación el DNA se transfería por capilaridad durante 12-15 h a una membrana de nylon GeneScreen Plus (Dupont) en condiciones alcalinas, usando como vehículo de transferencia NaOH 0,4 N.

Otras veces, la transferencia del DNA del gel a una membrana se realizaba mediante vacío, utilizando un aparato TransVac TE80 (Hoefer Scientific Instruments). En este caso, el tratamiento del gel consistía en sumergirlo e incubarlo durante 10 min secuencialmente en las siguientes disoluciones: (a) HCl 0,25 M, (b) NaOH 0,4 N, (c) Tris-HCl 1 M (pH 8,0), NaCl 1,5 M y (d) SSPE 20x. Entre las distintas incubaciones el gel se lavaba abundantemente con agua. La disolución SSPE 20x contiene NaCl 3 M, fosfato sódico 200 mM y EDTA 20 mM (pH 7,4). La disolución de transferencia en este caso era SSPE 20x.

Terminada la transferencia, por cualquiera de los dos métodos, la membrana se lavaba con SSPE 2x y, para que se fijara el DNA, se dejaba secar o se exponía a luz ultravioleta a $0,12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ en un aparato BioLink BLX-254 (SVL, Francia).

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

Tras 2-4 h de incubación a 65°C , se añadía la sonda de DNA marcada radiactivamente (ver apartado 2.7.12), desnaturalizada mediante incubación a 100°C durante 10 min seguida de enfriamiento inmediato a 4°C . Tras incubar durante 14-16 h en las mismas condiciones de la prehibridación, la membrana se lavaba dos veces con una disolución de SSPE 2x y SDS 0,1% (p/v) y una vez con SSPE 1x y SDS 0,1% (p/v), incubando 15 min cada vez. Estos lavados se realizaban a la misma temperatura de la hibridación. Las señales de hibridación se visualizaban mediante autorradiografía convencional con películas Kodak X-OMAT o autorradiografía electrónica en un detector bidimensional de partículas β "InstantImager" (Packard).

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

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un aparato "Mastercycler 5330" (Eppendorf). La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de $50 \mu\text{l}$, en una mezcla que contenía: 2-5 ng del DNA molde, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 50 pmol de cada cebador, 2,5 U de Taq polimerasa ("EcoTaq", Ecogen S.R.L.) y el tampón suministrado con la polimerasa por la casa comercial. A esta mezcla se le añadían $50 \mu\text{l}$ de aceite mineral para evitar la evaporación. Como molde para la amplificación se utilizaba DNA total aislado de cianobacterias o DNA plasmídico obtenido de *E. coli*.

El programa utilizado realizaba 30 ciclos de las siguientes incubaciones: desnaturalización, 1 min a 95°C ; alineamiento, 1 min a la temperatura más alta permitida por la pareja de cebadores utilizada (según las indicaciones del fabricante), y polimerización, mediante incubación a 72°C durante 1 min por cada kb a extender. Este conjunto de ciclos iba precedido de una incubación a 95°C durante 2 min y finalizaba con una incubación a 72°C durante 10 min. El resultado de la PCR se analizaba en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.7.6.

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

Arg 1: 5' CCCAAACAGTTTCTGGAGTCG 3'
Arg 2: 5' TTTTCCGTTGGGACTCTCCC 3'
Arg 3: 5' TATGAGCGATGCCACCCCG 3'
Arg 4: 5' TTGCCAGGGCTCATCCAC 3'
ArgD 1: 5' TTCCACGGCCGTACCCTAGC 3'
ArgD 2: 5' CCCCTGGCGGAGTTATCTGC 3'
GlnHP 1: 5' AATGCCAAGGAACTACCGCC 3'
GlnHP 2: 5' AAAAGGCGGTGAGGAGAACGG 3'
GltS 1: 5' TAAGCCCAGTTGATTACAGGC 3'
GltS 2: 5' CGCCAATGTCGGCTAAGGTCC 3'
Otc 3: 5' ATTAAGGCGTTGGCGGGCAGGG 3'
Otc 4: 5' CCCAAAAGGGCCACCATGAGGGC 3'
ProC 1: 5' GCTATGACCCCACCACCCTG 3'
ProC 2: 5' ATTTTGATGGCCCCACGGGC 3'
PutA 1: 5' TTCCCCATGGCGATCGCCGTT 3'
PutA 2: 5' CAAATAATCTGGTCCACCCG 3'
Tr 26: 5' ATTTTACAGTTATCCCAGGC 3'
Tr 27: 5' GCCAGCGATGTTGAAATCCAG 3'
Tr 28: 5' GCAATGACCAAGGCTTACCG 3'
Tr 29: 5' TGGCGACAATTAAAGTAGGC 3'
Tr 30: 5' GGTGGGAAGCATTATCGCCC 3'
Tr 31: 5' GAAAATTGGCCCGCTCCCGC 3'
Tr 32: 5' TTTCTCCATTGCGCCGGGGG 3'
Tr 33: 5' AGATGTTCCACCGCTTGGGC 3'
Tr 34: 5' TTAGTTTTGCCACGATCGCC 3'
Tr 35: 5' AAAGCCATAGGGCTCCAGGG 3'
Tr 38: 5' CCCCTGGCAGTGTTGGTAGG 3'
Tr 39: 5' CAAAGTTGCCCTTAGCGCCC 3'
Trap 1: 5' TTAGAGTCAAATTGTCCTCGC 3'
Trap 2: 5' CGGGGGCAACATCACCTGCAC 3'
Trap 3: 5' TTCCGGGTTTAACTGTCAGTG 3'
Trap 4: 5' AAAGATTAATGCTTCCAGGAG 3'

2.7.15. Secuenciación de DNA

Las reacciones de secuenciación se realizaban según el método descrito por Sanger *et al.* (1977), basado en la terminación de la elongación de cadenas de DNA por

incorporación de didesoxirribonucleótidos. Para llevar a cabo las reacciones se utilizaba el juego de reactivos "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia) y se seguían las instrucciones de la casa suministradora. El DNA a secuenciar se desnaturalizaba mediante tratamiento con NaOH 400 mM durante 10 min a temperatura ambiente y después se filtraba a través de una columna de Sephadex G-50. Se realizaba primero la reacción de elongación a partir del cebador. La mezcla de reacción correspondiente se dividía posteriormente en cuatro partes iguales que se procesaban por separado para llevar a cabo el proceso de terminación, añadiéndose a cada una de ellas uno de los cuatro didesoxirribonucleótidos. El marcaje radiactivo de las cadenas sintetizadas se realizaba con $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ ($1000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$). Los cebadores utilizados eran los denominados "universal -20" y "reverso" (Boehringer), cuyas secuencias coinciden con las que se encuentran en los vectores utilizados para la clonación en zonas adyacentes a los insertos que se deseaba secuenciar.

Los productos de la reacción de secuenciación se analizaban mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles se preparaban al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida, 29:1), en tampón TBE 1x conteniendo urea 4,7 M, y se polimerizaban mediante la adición de persulfato amónico 0,08% (p/v) y TEMED 6 mM, el cual actuaba como catalizador de la polimerización. Para facilitar la separación del gel de los cristales una vez concluida la electroforesis, los cristales se impregnaban, previamente a la preparación del gel, con una disolución repelente de silano de diclorodimetilo (Merck) tras lo cual se dejaban secar durante 1 h a temperatura ambiente. La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos modelo SE 1500 (Hoefer Scientific Instruments) a una potencia de 130 W. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfería a un papel Whatman 3MM y se secaba al vacío durante 90 min a 80°C en un secador de geles modelo SE 1160 (Hoefer Scientific Instruments). Finalmente, para visualizar los resultados, el gel seco se ponía en contacto con una película fotográfica Kodak X-OMAT que después se revelaba.

2.8. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS

2.8.1. Transformación de *E. coli*

Para preparar células de *E. coli* que pudieran incorporar DNA mediante transformación se seguía el método descrito por Hanahan (1983). Se inoculaban matraces de 500 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio Ψ , con 1 ml de un cultivo saturado de *E. coli* en el mismo medio. Estos matraces se incubaban a 37°C con

agitación durante 2-3 h hasta que el cultivo alcanzaba una $A_{550\text{nm}}=0,48$. Las células se enfriaban entonces en hielo durante 10 min, tras lo cual se recogían por centrifugación a 4°C y se resuspendían en 30 ml de disolución TjBI (RbCl 100 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl_2 10 mM y glicerol 15% [v/v]; pH 5,8 ajustado con ácido acético) a 4°C. La suspensión celular resultante se centrifugaba a 4°C y las células se resuspendían en 4 ml de disolución TjBII (MOPS-NaOH 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl_2 25 mM, glicerol 15% [v/v]; pH 7,0) a 4°C. Ambas disoluciones se habían esterilizado mediante filtración usando filtros Nalgene (0,2 μm de diámetro de poro). La suspensión celular obtenida se distribuía en alícuotas de 100 μl que se congelaban inmediatamente con nitrógeno líquido y se conservaban a -80°C.

La transformación se llevaba a cabo mezclando un alícuota de 100 μl de suspensión de células transformables con 10 μl de la preparación de DNA a transferir. La mezcla se incubaba en hielo durante 15 min, tras lo cual se sometía a un choque térmico mediante incubación a 42°C durante 40 s. Después se incubaba 7 min a temperatura ambiente, se agregaba 1 ml de medio LB y se incubaba durante 1 h en condiciones de cultivo. Por último, las células se sembraban en cajas de Petri conteniendo medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transformantes. Cuando se utilizaban plásmidos que permitían la identificación de clones con inserto gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio de cultivo se suplementaba con IPTG 0,2 mM y X-gal 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Las colonias portadoras de plásmido con inserto mostraban color blanco, mientras que las portadoras del vector sin inserto eran de color azul.

2.8.2. Transformación de *Synechocystis* sp.

La introducción de DNA en *Synechocystis* sp. se realizaba siguiendo el método descrito por Chauvat *et al.* (1986), con algunas modificaciones. Las células se cultivaban en matraces conteniendo 50 ml de medio de cultivo BG11, hasta que se alcanzaba una $A_{580\text{nm}}=1-1,5$; entonces se recogían por centrifugación, se lavaban tres veces con medio BG11 y se resuspendían en 2 ml del mismo medio. Después se mezclaban 200 μl de suspensión celular con 10 μl de DNA (al menos 2-3 μg de DNA total de células ó 0,2-0,3 μg de DNA plasmídico) resuspendido en T1/10E (pH 8,0), en un tubo de paredes transparentes. La mezcla se incubaba durante 1 h a 30°C con luz y sin agitación, tras lo cual se sembraba sobre un filtro de nitrocelulosa (Nucleopore, REC-85) dispuesto en una caja de Petri conteniendo medio sólido BG11. Tras 24 horas de incubación en condiciones de cultivo, el filtro se transfería a otra caja de medio BG11 conteniendo 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de Km, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de Cm o ambos, según la resistencia a antibiótico aportada por el DNA transferido, y se continuaba la incubación en condiciones de cultivo. Las

colonias resistentes, que aparecían tras 10-15 días de incubación, se sembraban en medio selectivo.

2.9. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS

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

La conexión con el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA) permitió la utilización del paquete informático del Genetics Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984). Asimismo, la conexión con Internet permitió la utilización del paquete informático Pedro's Biomolecular Research Tools y de las aplicaciones de la "Cyanobase" (Kaneko *et al.*, 1996). La búsqueda en las bases de datos de secuencias similares a las analizadas en este trabajo se realizó mediante las aplicaciones FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

Uno de los objetivos de este trabajo era la identificación y el análisis de los sistemas de transporte de aminoácidos de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803. Al comienzo del mismo, sólo se habían clonado y analizado dos de los genes responsables de la actividad de transporte de aminoácidos neutros en esta cianobacteria, *natA* y *natB* (Montesinos *et al.*, 1997).

Durante el desarrollo de esta tesis, se hizo disponible en las bases de datos en principio un 28% de la secuencia del cromosoma de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995) y, posteriormente, la secuencia completa (Kaneko *et al.*, 1996). El hecho de encontrarse disponible esta secuencia nos permitió hacer una búsqueda exhaustiva de ORFs cuyos productos hipotéticos fueran homólogos a proteínas de otros organismos implicadas en el transporte de aminoácidos a través de membranas.

Aunque existe controversia en el caso de las proteínas de transporte sobre si la homología refleja la naturaleza exacta del sustrato transportado (Paulsen *et al.*, 1998) o no (Higgins *et al.*, 1990), éste fue el criterio en base al cual se seleccionaron todas las ORFs relacionadas con transporte que han sido objeto de estudio en este trabajo.

3.1.1. ORFs investigadas y metodología utilizada

La Tabla 3 recoge las ORFs del cromosoma de la estirpe PCC 6803 seleccionadas para su análisis en este trabajo. La selección se basó en comparaciones con los bancos de datos de proteínas, hechas por nosotros mediante la utilización de los programas FASTA y BLAST (Pearson y Lipman, 1988; Altschul *et al.*, 1990), junto con aquéllas publicadas por los autores del proyecto de secuenciación del cromosoma de *Synechocystis* sp. (Kaneko *et al.*, 1996) y por un grupo especializado en el estudio de proteínas de membrana (Paulsen *et al.*, 1998). Como se puede observar en la Tabla, en general se trata de ORFs cuyos productos hipotéticos serían proteínas homólogas a proteínas transportadoras de aminoácidos en otros organismos.

Tabla 3. ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas de transporte de otros organismos y que fueron seleccionadas para su estudio en este trabajo.

ORF	Longitud (aa)	Proteínas homólogas de otros organismos:	Identities (%)
<i>slr0949</i>	286	BraD, proteína de membrana del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
<i>slr1881</i>	240	BraG, una subunidad de "componente conservado" (ATPasa) del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
<i>sll0146</i>	372	BraE, proteína de membrana del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
<i>sll1270</i>	530	GlnH/GlnP, proteína periplásmica de unión de glutamina/proteína de membrana del transportador de glutamina de <i>Bacillus subtilis</i>	47
<i>slr1735</i>	252	HisP, "componente conservado" del transportador de histidina de <i>Salmonella typhimurium</i> y GlnQ, "componente conservado" del transportador de glutamina de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	72,62
<i>slr1145</i>	402	GltS, permeasa de glutamato de <i>Escherichia coli</i>	42
<i>sll1102^a</i>	179	DctQ, proteína integral de membrana de transporte de C ₄ -dicarboxilatos en <i>Rhodobacter capsulatus</i>	30
<i>sll1103^a</i>	445	DctM, proteína integral de membrana de transporte de C ₄ -dicarboxilatos en <i>Rhodobacter capsulatus</i>	28
<i>sll1104</i>	296	GlnH, proteína periplásmica de unión de glutamina de <i>Bacillus</i> sp.	35
<i>slr0401</i>	384	Proteína periplásmica de unión de espermidina-putrescina de <i>Escherichia coli</i>	31
<i>slr1257^a</i>	397	Canal de K ⁺ de <i>Streptomyces lividans</i> y ORF <i>sll1270</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	48,26

^aEn estos casos Kaneko *et al.* (1996) no aportaban ninguna homología.

La estrategia general que se siguió para el estudio de estas ORFs consistió en la amplificación mediante PCR de la ORF o de un fragmento de la misma, la clonación del fragmento de DNA así generado en un vector apropiado, la inserción de una casete de resistencia a un antibiótico interrumpiendo la ORF y la transferencia de la construcción resultante a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante transformación con el fin de reemplazar el gen silvestre de dicha estirpe por la versión mutada, estudiándose después las actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes mutantes generadas. Para las amplificaciones de DNA, se utilizaron como cebadores oligonucleótidos de 20-21 bases de longitud (ver materiales y métodos), que apareaban con secuencias internas o adyacentes a dichas ORFs.

3.1.2. Identificación de genes responsables del transporte de aminoácidos neutros

Se clonaron las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146* siguiendo la estrategia descrita de amplificación mediante PCR de fragmentos de DNA incluyendo parte de dichas ORFs y, posteriormente, se llevó a cabo la inserción en estos fragmentos de DNA de una casete de resistencia a un antibiótico.

Tabla 4. Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs *sll0146*, *sll1102*, *sll1103*, *sll1104*, *sll1270*, *slr0401*, *slr0949*, *slr1145*, *slr1257*, *slr1735* y *slr1881* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSMJ22	Fragmento de 1029 pb de la ORF <i>slr1145</i> , amplificado con los cebadores GltS 1 y GltS 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ23	Fragmento <i>SacI-HincII</i> de pCSMJ22, conteniendo el fragmento amplificado de la ORF <i>slr1145</i> , clonado en pBluescript SK(+).
pCSMJ24a	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1145</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>NcoI</i> de pCSMJ23, en la misma orientación que la ORF.
pCSMJ25	Fragmento de 1000 pb de la ORF <i>sll1270</i> , amplificado con los cebadores GlnHP 1 y GlnHP 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ26	Plásmido que contiene la ORF <i>sll1270</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>KpnI</i> de pCSMJ25.
pCSMJ29	Fragmento de 1153 pb de la ORF <i>slr1735</i> , amplificado con los cebadores Tr 26 y Tr 27, clonado en pGEM-T.
pCSMJ30a	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1735</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ29, en la misma orientación que la ORF.
pCSMJ30b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1735</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ29, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSMJ31	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1145</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>NcoI</i> de pCSMJ23.
pCSMJ32	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1735</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ29.
pCSMJ39	Fragmento de 937 pb de la ORF <i>slr0401</i> , amplificado con los cebadores Tr 28 y Tr 29, clonado en pGEM-T.
pCSMJ40	Fragmento de 1233 pb de la ORF <i>slr0949</i> , amplificado con los cebadores Tr 30 y Tr 31, clonado en pGEM-T.
pCSMJ41	Fragmento de 930 pb de la ORF <i>slr1881</i> , amplificado con los cebadores Tr 32 y Tr 33, clonado en pGEM-T.
pCSMJ42	Fragmento de 994 pb de la ORF <i>slr1257</i> , amplificado con los cebadores Tr 34 y Tr 35, clonado en pGEM-T.
pCSMJ43a	Plásmido que contiene la ORF <i>slr0401</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>XbaI</i> de pCSMJ39, en la misma orientación que la ORF.
pCSMJ43b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr0401</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>XbaI</i> de pCSMJ39, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSMJ44b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr0949</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>HpaI</i> de pCSMJ40, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSMJ45b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1881</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>StuI</i> de pCSMJ41, en orientación opuesta a la de la ORF.

pCSMJ46b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1257</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>EcoRI</i> de pCSMJ42, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSMJ53	Fragmento de 956 pb de la ORF <i>sll0146</i> , amplificado con los cebadores Tr 38 y Tr 39, clonado en pGEM-T.
pCSMJ54a	Plásmido que contiene la ORF <i>sll0146</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ53, en la misma orientación que la ORF.
pCSMJ54b	Plásmido que contiene la ORF <i>sll0146</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ53, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSX65	Fragmento de 1399 pb que contiene la ORF <i>sll1102</i> y parte de la <i>sll1103</i> , amplificado con los cebadores Trap 1 y Trap 2, clonado en pGEM-T.
pCSX66	Fragmento de 1104 pb de la ORF <i>sll1104</i> , amplificado con los cebadores Trap 3 y Trap 4, clonado en pGEM-T.
pCSX67 ^a	Plásmido que contiene las ORFs <i>sll1102</i> y <i>sll1103</i> interrumpidas por inserción de la casete C.K3 en los dos sitios <i>BamHI</i> de pCSX65 delecionando un fragmento de 370 pb.
pCSX68 ^a	Plásmido que contiene la ORF <i>sll1104</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>XbaI</i> de pCSX66.

^aEn estos casos no se determinó la orientación de la casete C.K3.

Como resultado de las amplificaciones se obtuvieron fragmentos de DNA de entre 930 y 1240 pb, que se clonaron en el vector pGEM-T (Tabla 2, materiales y métodos), generándose los plásmidos pCSMJ40, pCSMJ41 y pCSMJ53 (Tabla 4) que contenían la mayor parte de las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146*, respectivamente. Dichos plásmidos se digirieron con endonucleasas de restricción para las que se encontraba un solo sitio de corte en cada uno de los plásmidos, situado en sus insertos, introduciéndose en cada uno de estos sitios la casete C.K3 (Tabla 2, materiales y métodos). Así se generaron los plásmidos pCSMJ44b, pCSMJ45b, pCSMJ54a y pCSMJ54b (Tabla 4). En el caso de pCSMJ44 y pCSMJ45 la casete C.K3 se insertó en una única orientación, contraria a la de la ORF; para la ORF *sll0146* se obtuvieron dos plásmidos con la versión mutada de la ORF, un plásmido con C.K3 en la misma orientación que la ORF (pCSMJ54a) y el otro con C.K3 en orientación contraria (pCSMJ54b). (En todo el texto de este trabajo, las letras a y b al final del nombre del plásmido hacen referencia a si la casete introducida se encontraba en la misma orientación que la ORF o en orientación contraria, respectivamente.) Se transformó la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. con estos plásmidos y se seleccionaron colonias resistentes a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Km, a partir de las cuales se volvieron a obtener colonias aisladas, inóculos de las cuales se cultivaron en medio BG11 líquido suplementado con Km a concentraciones de entre 30 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tras unos días de incubación en estas condiciones, se aisló el DNA genómico de los cultivos y se comprobó la estructura cromosómica de los clones mediante PCR (Figura 2). Para cada mutación se obtuvo un clon segregado, en el que no se observaba DNA amplificado del tamaño correspondiente al gen silvestre, denominándose CSMJ36b (*slr0949*), CSMJ37b (*slr1881*), CSMJ41a (*sll0146*) y CSMJ41b (*sll0146*) a las estirpes mutantes generadas.

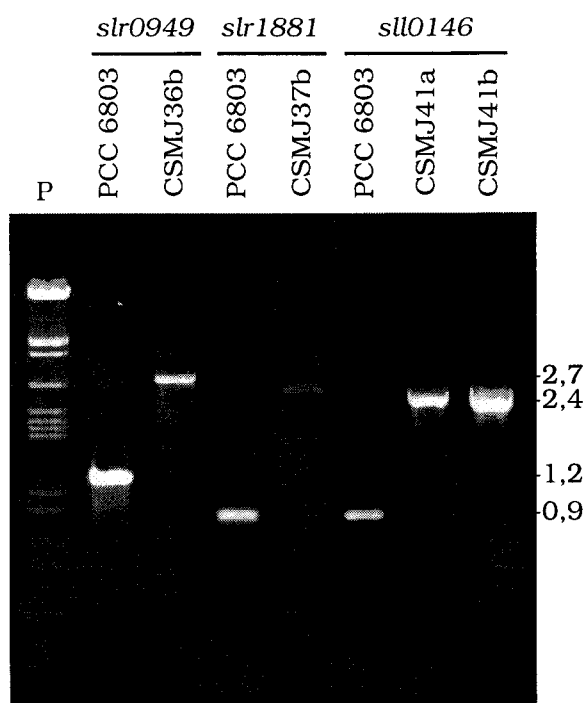


Figura 2. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ36b, CSMJ37b, CSMJ41a y CSMJ41b.

El DNA genómico de las estirpes mutantes CSMJ36b, CSMJ37b, CSMJ41a y CSMJ41b se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores las parejas de oligonucleótidos empleadas para la clonación de cada una de las ORFs correspondientes. Como control se presenta la amplificación obtenida en cada caso con DNA de la estirpe silvestre, PCC 6803. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular resultantes de la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) de algunos fragmentos, estimado en base a los de dichos marcadores.

Se realizaron ensayos de transporte de aminoácidos con los mutantes obtenidos, con el fin de estudiar si las ORFs inactivadas en cada uno de ellos determinaban proteínas implicadas en el transporte de aminoácidos en la estirpe PCC 6803 (Tabla 5). Las estirpes mutantes CSMJ36b (alterada en la ORF *slr0949*), CSMJ37b (alterada en la ORF *slr1881*) y CSMJ41a y CSMJ41b (alteradas en la ORF *sll0146*), resultaron estar severamente afectadas en el transporte de aminoácidos neutros (excepto glutamina). Para el resto de los aminoácidos ensayados, excepto el aspartato, las actividades de transporte exhibidas por cada uno de estos mutantes eran similares a las de la estirpe silvestre PCC 6803. En el caso del aspartato admitimos una mayor variabilidad en los resultados debido a la baja actividad de transporte de este sustrato en esta cianobacteria, lo que dificulta su determinación. No obstante, estos mutantes se podrían considerar parcialmente alterados en el transporte de aspartato.

El fenotipo de transporte de aminoácidos de los mutantes CSMJ36b, CSMJ37b, CSMJ41a y CSMJ41b sugería que las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146* corresponden a

genes que determinan proteínas necesarias para el transporte de aminoácidos neutros en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. El hecho de que la mutación de cada una de las ORFs anulase de forma casi total la actividad de transporte de aminoácidos neutros (excepto glutamina) sugería que la tres ORFs determinarían elementos de un mismo sistema de transporte, adscribiéndose al sistema Nat para el transporte de aminoácidos neutros descrito para esta cianobacteria (Montesinos *et al.*, 1997). Se denominó *natD* a la ORF *slr0949*, *natE* a la ORF *slr1881* y *natC* a la ORF *sll0146*. Por lo tanto, teniendo en cuenta los dos genes previamente identificados, que son diferentes a éstos, puede deducirse que el sistema multicomponente responsable del transporte de aminoácidos neutros (excepto glutamina) de esta cianobacteria consta de los productos de al menos cinco genes diferentes.

Tabla 5. Actividades de transporte de aminoácidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes de las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146*.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos presentados son la media de los obtenidos en 4-6 ensayos independientes en el caso del silvestre y 2-4 en los mutantes.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)				
	PCC6803	Estirpe:			
		CSMJ36b (<i>slr0949</i>) ^a	CSMJ37b (<i>slr1881</i>)	CSMJ41a (<i>sll0146</i>)	CSMJ41b (<i>sll0146</i>)
Básicos					
Arg	5407,7	4250,0 (79%) ^b	3925,1 (73%)	3677,2 (68%)	3947,6 (73%)
Lys	598,5	537,1 (90%)	467,1 (78%)	460,8 (77%)	478,8 (80%)
Neutros					
Ala	103,5	1,6 (1%)	1,4 (1%)	3,1 (3%)	0,6 (<1%)
Gln	66,8	65,5 (98%)	50,9 (76%)	54,8 (82%)	59,4 (89%)
Gly	85,4	1,3 (1%)	1,1 (1%)	0,6 (<1%)	0,6 (<1%)
Pro	51,7	0,6 (1%)	0,5 (1%)	0,5 (1%)	0,6 (<1%)
Ser	70,6	1,2 (2%)	1,3 (2%)	1,4 (2%)	1,4 (2%)
Leu	75,5	1,2 (2%)	1,1 (1%)	0,8 (1%)	0,9 (1%)
Ácidos					
Glu	649,4	527,5 (81%)	637,5 (98%)	428,6 (66%)	461,1 (71%)
Asp	5,2	3,2 (62%)	1,0 (20%)	2,9 (55%)	3,3 (63%)

^aSe indica la ORF inactivada en cada una de las estirpes mutantes.

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

3.1.3. Identificación de genes responsables del transporte de aminoácidos básicos y glutamina

3.1.3.1. Generación y caracterización de los mutantes BgtA y BgtB

Las ORFs *sll1270* y *slr1735* determinarían proteínas homólogas a elementos de transportadores de glutamina o aminoácidos básicos (Tabla 3). El producto hipotético de la *sll1270* tiene una longitud de 530 aminoácidos y parece una proteína "híbrida", de modo que desde su extremo amino hasta el aminoácido 270 muestra homología con proteínas periplásmicas de unión de sustrato, mientras que desde este aminoácido hasta el extremo carboxilo presenta homología con proteínas integrales de membrana, ambas características de sistemas de transporte de tipo ABC. El perfil de hidrofobicidad que muestra esta hipotética proteína (Figura 3) estaría en concordancia con estas homologías, de manera que desde aproximadamente la mitad de la proteína hasta el final se encuentran seis posibles dominios de expansión de membrana, perfil típico de las proteínas integrales de membrana pertenecientes a los sistemas de transporte de tipo ABC. Nótese asimismo la presencia de otro posible segmento de expansión de membrana en el extremo amino de la proteína.

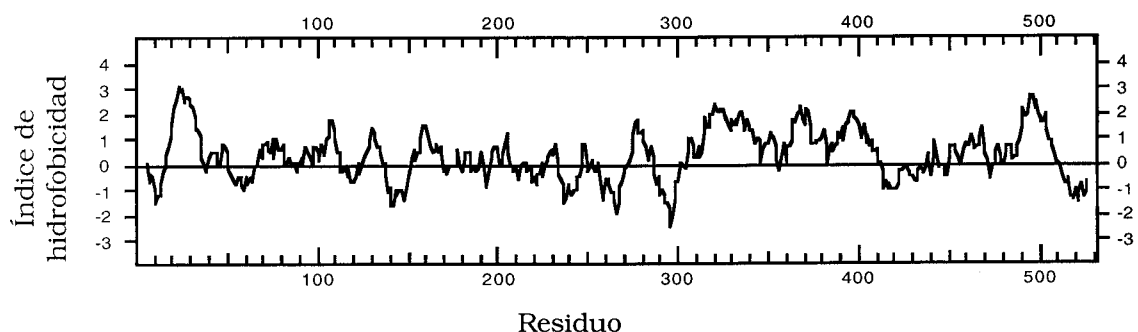


Figura 3. Perfil de hidrofobicidad de la proteína hipotética determinada por la ORF *sll1270* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

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

La ORF *slr1735* determinaría el polipéptido de *Synechocystis* sp. con mayor parecido al componente conservado (ATPasa) de los sistemas de transporte de aminoácidos básicos de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, la proteína HisP (Ames, 1986).



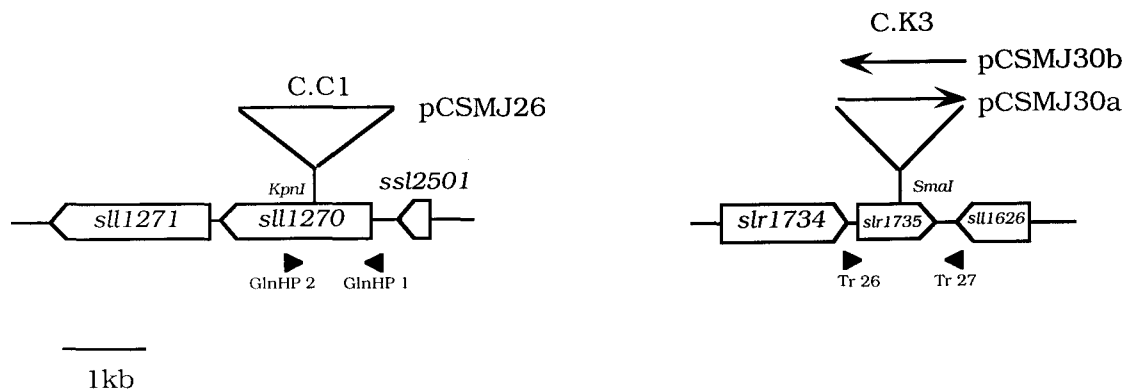


Figura 4. Representación esquemática de las ORFs *sll1270* y *slr1735* del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y su inactivación mediante inserción de casetes de resistencia a antibióticos.

Se representan las ORFs seleccionadas para su inactivación, así como las ORFs adyacentes. Se indican (mediante triángulos negros) la localización de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación por PCR de fragmentos pertenecientes a dichas ORFs, las dianas de restricción empleadas para insertar los casetes y el nombre del plásmido generado en cada caso.

Mediante amplificación por PCR se obtuvieron fragmentos de DNA de entre 1 y 1,2 kb de longitud que se clonaron en el vector pGEM-T, generándose los plásmidos pCSMJ25 y pCSMJ29 que contenían parte de la ORF *sll1270* y la totalidad de la ORF *slr1735*, respectivamente (Tabla 4). El plásmido pCSMJ25 se digirió con la endonucleasa de restricción *KpnI*, para la que se encuentra un único sitio de corte localizado en el inserto, y en dicho sitio se introdujo el casete C.C1 (1,9 kb) (véase Tabla 2, materiales y métodos), que confiere resistencia a cloranfenicol y posee terminadores de la transcripción, generándose así el plásmido pCSMJ26 (Tabla 4; Figura 4). Por otro lado, el plásmido pCSMJ29 se digirió con la endonucleasa de restricción *SmaI*, para la que se encuentra un sitio único de restricción localizado en el inserto, introduciéndose en el mismo el casete C.K3 (1,480 kb) que confiere resistencia a kanamicina y no posee terminadores de la transcripción, generándose así los plásmidos pCSMJ30a y pCSMJ30b (Figura 4). Estos plásmidos se utilizaron para transformar la estirpe silvestre *Synechocystis* sp. PCC 6803, seleccionándose colonias aisladas resistentes a Cm y Km, respectivamente. Las estirpes mutantes que se obtuvieron se denominaron CSMJ7 (*sll1270*::C.C1) y CSMJ8a y CSMJ8b (*slr1735*::C.K3).

La correcta estructura cromosómica de los tres mutantes se comprobó mediante PCR, utilizando para ello DNA genómico de los mismos como molde y, como cebadores, los oligonucleótidos que se habían utilizado para la clonación de cada ORF. Los productos de estas reacciones se resolvieron en geles de agarosa, observándose un incremento de tamaño de 1,9 kb en el caso de la estirpe CSMJ7 y de aproximadamente 1,5 kb en los casos de las estirpes CSMJ8a y CSMJ8b, correspondiéndose este incremento con el tamaño del fragmento insertado en cada caso. En los tres casos,

además de estas bandas de DNA de mayor tamaño, se observaron bandas correspondientes al tamaño de la ORF amplificada sin la inserción de la casete, lo que indicaba que las estirpes poseían mezclas de cromosomas, mutantes y no mutantes. Para obtener clones mutantes cromosómicamente homogéneos, en los que no existieran copias silvestres de los genes mutados, se procedió a cultivar colonias aisladas de cada estirpe en pequeños volúmenes de medio de cultivo suplementado con altas concentraciones del antibiótico. En el caso de los clones generados con la casete C.K3, se usaron concentraciones de Km de entre 30 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, y para los generados con la C.C1 concentraciones de Cm de entre 10 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tras varias generaciones celulares se aisló DNA genómico y se repitió el análisis mediante PCR, comprobándose entonces que se habían conseguido suspensiones de células en las que todas las copias del cromosoma tenían la ORF correspondiente inactivada (Figura 5).

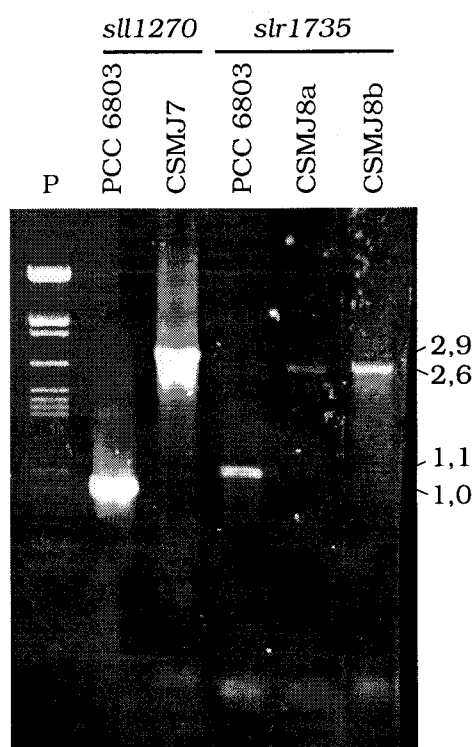


Figura 5. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.

El DNA genómico de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores las parejas de oligonucleótidos GlnHP 1 y GlnHP 2 en el caso de CSMJ7 y Tr 26 y Tr 27 para CSMJ8a y CSMJ8b. Como control se presenta la amplificación obtenida en cada caso con DNA de la estirpe silvestre, PCC 6803. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *Clal* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) de algunos fragmentos, estimado por comparación con dichos marcadores.

Se determinaron las actividades de transporte de los mutantes obtenidos, utilizándose como sustrato una serie de aminoácidos que incluía aminoácidos básicos, ácidos y neutros.

Tabla 6. Actividades de transporte de aminoácidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Cm o con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos son la media de los valores obtenidos en 4-6 ensayos independientes para PCC 6803 y 2-4 ensayos para CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)			
	Estirpe:			
	PCC6803	CSMJ7 (<i>sll1270</i>) ^a	CSMJ8a (<i>slr1735</i>)	CSMJ8b (<i>slr1735</i>)
Básicos				
Arg	5407,7	130,0 (2%) ^b	137,0 (2%)	110,3 (2%)
Lys	598,5	1,7 (<1%)	2,4 (<1%)	1,3 (<1%)
Neutros				
Ala	103,5	82,9 (80%)	104,5 (101%)	84,3 (81%)
Gln	66,8	12,8 (19%)	15,8 (24%)	12,2 (18%)
Gly	85,4	68,6 (80%)	84,4 (99%)	74,1 (87%)
Pro	51,7	40,9 (79%)	56,9 (110%)	45,8 (89%)
Ser	70,6	55,1 (78%)	47,6 (67%)	65,9 (93%)
Ácidos				
Glu	649,4	642,0 (99%)	480,3 (74%)	425,5 (66%)

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

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

Las estirpes mutantes CSMJ7 (alterada en la ORF *sll1270*) y CSMJ8a y CSMJ8b (alteradas en la ORF *slr1735*) resultaron estar severamente afectadas en el transporte de los aminoácidos básicos arginina y lisina (Tabla 6). El transporte de glutamina también se veía disminuido aproximadamente en un 80%. Para el resto de los aminoácidos neutros ensayados, así como para el glutamato, las actividades de transporte presentadas por cada uno de estos mutantes podían considerarse similares a las de la estirpe silvestre.

Como los aminoácidos cuyo transporte estaba alterado en estos mutantes eran los aminoácidos básicos y la glutamina, nos centramos en el estudio de los mismos como sustrato. Se llevaron a cabo ensayos de transporte con las estirpes mutantes CSMJ7,

CSMJ8a y CSMJ8b utilizando como sustrato la arginina, la lisina, la histidina y la glutamina, a concentraciones 1, 10 y 100 μM de cada uno de ellos (Tabla 7).

Tabla 7. Actividades de transporte de aminoácidos básicos y glutamina de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Cm o con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a las concentraciones que se detallan, de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg). Los datos son la media de los valores obtenidos en 2-4 ensayos independientes.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)			
	Estirpe:			
	PCC6803	CSMJ7 (<i>slr1270</i>) ^a	CSMJ8a (<i>slr1735</i>)	CSMJ8b (<i>slr1735</i>)
Arg				
1 μM	1476,0	11,0 (<1%) ^b	9,8 (<1%)	10,0 (<1%)
10 μM	5407,7	130,0 (2%)	137,0 (2%)	110,3 (2%)
100 μM	5820,0	1220,0 (21%)	970,0 (17%)	1120,0 (19%)
Lys				
1 μM	98,0	0,2 (<1%)	0,2 (<1%)	0,1 (<1%)
10 μM	598,5	1,7 (<1%)	2,4 (<1%)	1,3 (<1%)
100 μM	1443,9	14,0 (<1%)	19,0 (1%)	20,0 (1%)
His				
1 μM	10,3	2,3 (22%)	3,0 (29%)	2,4 (23%)
10 μM	60,9	5,7 (9%)	6,0 (10%)	8,8 (14%)
100 μM	421,2	16,6 (4%)	19,4 (5%)	10,2 (2%)
Gln				
1 μM	13,1	5,1 (39%)	6,6 (50%)	5,4 (41%)
10 μM	66,8	12,8 (19%)	15,8 (24%)	12,2 (18%)
100 μM	476,3	22,5 (5%)	24,6 (5%)	24,3 (5%)

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

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

Cuando el sustrato utilizado era la glutamina a concentración 1 μM el transporte en los mutantes era entre un 39 y un 50% del presentado por la estirpe silvestre, mientras que a concentración 10 μM éste era de un 18-24% y a concentración 100 μM tan sólo de un 5%. El comportamiento de estos mutantes con respecto al transporte de histidina suministrada a las mismas concentraciones era similar al observado para el transporte de glutamina. En los casos en los que el aminoácido



sustrato era la arginina, los resultados obtenidos, tanto en el mutante de la ORF *sll1270* (CSMJ7) como en los mutantes de la ORF *slr1735* (CSMJ8a y CSMJ8b), indicaron que el transporte estaba más severamente afectado a las concentraciones más bajas, siendo a 1 μ M la incorporación de arginina al interior celular prácticamente nula. En los tres mutantes, CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b, el transporte de lisina se veía muy disminuido ($\leq 1,5\%$ de la actividad de PCC 6803) para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas.

El fenotipo de transporte de aminoácidos mostrado por los mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b indica que las ORFs *sll1270* y *slr1735* corresponden a genes que determinan proteínas necesarias para el transporte de aminoácidos básicos y glutamina en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. El hecho de que la mutación independiente de cada una de estas ORFs inactive de forma similar el transporte de los aminoácidos básicos y de la glutamina sugiere que ambas ORFs determinarían elementos de un mismo sistema de transporte. Se denominó *bgtA* a la ORF *slr1735* y *bgtB* a la ORF *sll1270* (*bgt* de "basic amino acid and glutamine transport"). De esto se deduce que el sistema responsable del transporte de aminoácidos básicos y glutamina de *Synechocystis* sp. es de tipo ABC. Los genes *bgtA* y *bgtB* se encuentran distantes (posición 1317 kb y 1116 kb, respectivamente) en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Estos resultados también permiten deducir que debe haber otro(s) sistema(s) de transporte de glutamina e histidina de alta afinidad, así como otro sistema de baja afinidad de transporte de arginina, dado que el transporte de glutamina e histidina estaba menos afectado a la menor concentración de sustrato ensayada y el de arginina estaba menos afectado a la mayor concentración de sustrato (Tabla 7).

También se generaron mutantes dobles afectados al mismo tiempo en la ORF *sll1270* y en la ORF *slr1735*. Para la generación de estos mutantes, se transformó la estirpe CSMJ7 con los plásmidos pCSMJ30a y pCSMJ30b (Tabla 4). Se obtuvieron colonias aisladas resistentes a Cm y Km que se cultivaron en medio BG11 suplementado con una cantidad fija de Cm (10 μ g·ml⁻¹) y con cantidades crecientes de Km (entre 30 y 300 μ g·ml⁻¹), tras lo cual se analizó por PCR el grado de segregación. La PCR se llevó a cabo utilizando como molde DNA genómico de cultivos procedentes de los clones mutantes y como cebadores los oligonucleótidos que se habían utilizado para la clonación de la ORF *slr1735*. Se obtuvieron bandas únicas de DNA, cuyo tamaño correspondía a la suma del tamaño de dicha ORF más el tamaño de la casete C.K3 (Figura 6). La ausencia de una banda a la altura correspondiente a la amplificación de la ORF sin la casete indicaba la total segregación de los mutantes. Los mutantes así obtenidos se denominaron, CSMJ11a y CSMJ11b.

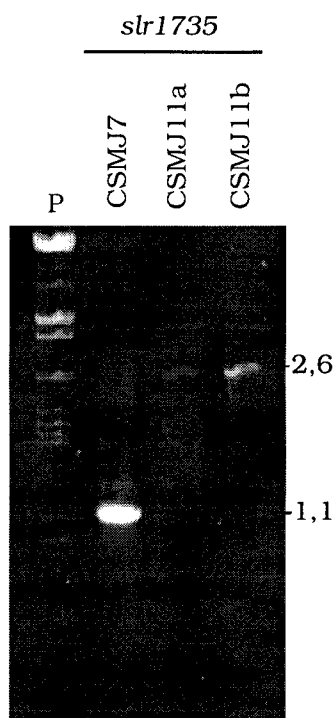


Figura 6. Estudio de la estructura de la región cromosómica conteniendo la nueva mutación introducida en las estirpes CSMJ11a y CSMJ11b.

El DNA genómico de las estirpes mutantes CSMJ11a y CSMJ11b y de su estirpe parental CSMJ7 se analizó mediante amplificación por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos Tr 26 y Tr 27. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) de los fragmentos obtenidos, estimado por comparación con dichos marcadores.

Se realizaron ensayos de transporte utilizando como sustrato el mismo grupo de aminoácidos que se había utilizado con los mutantes simples, y a las mismas concentraciones. Las actividades de transporte de los aminoácidos ensayados en estos mutantes, CSMJ11a y CSMJ11b eran del mismo orden que las detectadas en los mutantes simples correspondientes, CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ8b (los resultados se resumen en la Tabla 8 más adelante).

Estos resultados confirman que BgtA y BgtB son elementos del mismo sistema de transporte de aminoácidos básicos y glutamina.

3.1.3.2. Ensayos de crecimiento de los mutantes Bgt

Synechocystis sp. PCC 6803 es capaz de utilizar arginina como fuente de nitrógeno (Flores y Muro-Pastor, 1990). Con el fin de estudiar el grado en el que estaba alterado el crecimiento de los mutantes de los genes *bgtA* y *bgtB* en medios suplementados con arginina como única fuente de nitrógeno, se realizaron curvas de

crecimiento de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSMJ7, CSMJ8a y CSMJ11a.

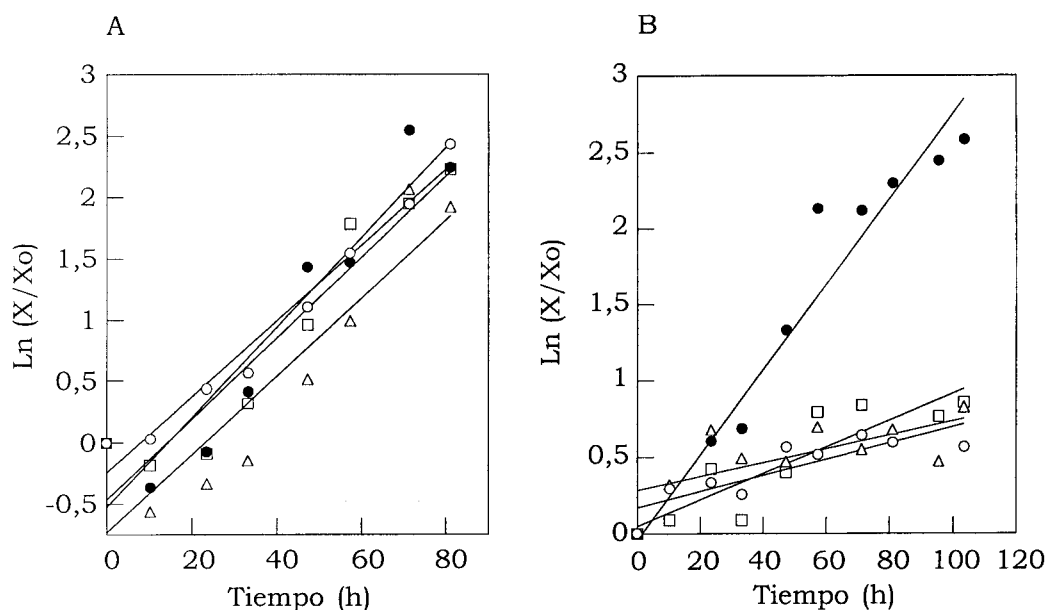


Figura 7. Curvas de crecimiento con nitrato o arginina como fuente de nitrógeno de los mutantes CSMJ7 (*bgtB*), CSMJ8a (*bgtA*) y CSMJ11a (*bgtA*, *bgtB*).

Células de las estirpes PCC 6803 (●), CSMJ7 (□), CSMJ8a (▲) y CSMJ11a (○) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el antibiótico correspondiente en el caso de los mutantes), se lavaron con medio BG11₀ y se resuspendieron en medio BG11 (A) o BG11₀ + 5 mM arginina (B) sin antibióticos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína del cultivo. X, μg de proteína·ml⁻¹ tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína·ml⁻¹ a tiempo cero.

Utilizando nitrato como fuente de nitrógeno, las tasas de crecimiento (μ) de los mutantes eran similares a la de la estirpe silvestre, del orden de 0,8 días⁻¹ (Figura 7A). Sin embargo, en medios con arginina como fuente de nitrógeno, las tasas de crecimiento de las estirpes mutantes CSMJ7 (0,21 días⁻¹), CSMJ8a (0,11 días⁻¹) y CSMJ11a (0,13 días⁻¹) eran menores que la de la estirpe silvestre (0,67 días⁻¹) (Figura 7B). Este resultado es consistente con que la arginina sea uno de los aminoácidos cuyo transporte está seriamente afectado en estos mutantes y, por otra parte, con la posible existencia de un segundo sistema de transporte de arginina.

Por otro lado, se sabe que el crecimiento de la estirpe PCC 6803 se inhibe por varios análogos de aminoácidos y por aminoácidos naturales tales como la histidina, la lisina y la glutamina (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Al ser las estirpes CSMJ7, CSMJ8a, CSMJ8b, CSMJ11a y CSMJ11b mutantes afectados en el transporte de aminoácidos básicos y glutamina, debían presentar algún grado de resistencia a la toxicidad de estos metabolitos. Para comprobarlo, se sembraron gotas, que contenían

aproximadamente 8×10^3 células de la estirpe silvestre o de cada una de estas estirpes mutantes, en cajas de medio BG11 suplementadas con los aminoácidos o análogos que se especifican en la Figura 8, a la concentración indicada en cada caso.

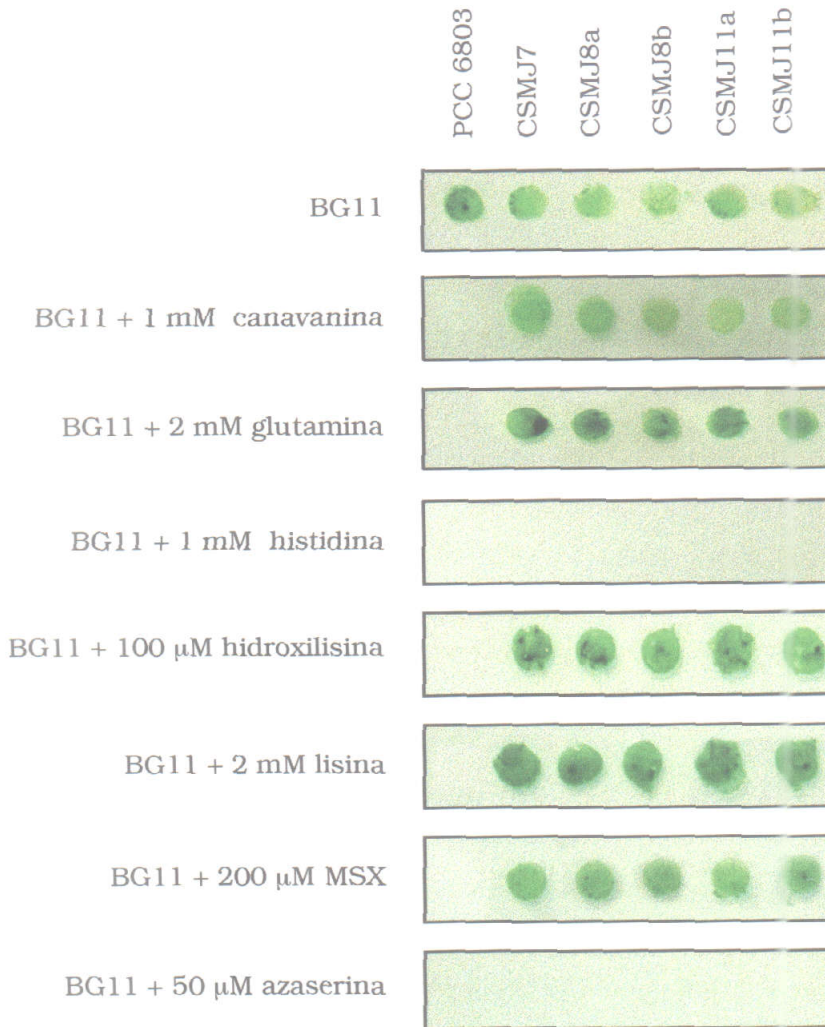


Figura 8. Ensayo de crecimiento de la estirpe PCC 6803 y estirpes mutantes del sistema Bgt en presencia de algunos aminoácidos y análogos de aminoácidos.

Gotas conteniendo, en medio BG11₀, aproximadamente 8×10^3 células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 o de los mutantes CSMJ7, CSMJ8a, CSMJ8b, CSMJ11a y CSMJ11b, se sembraron en cajas de BG11 y de BG11 suplementadas con canavanina 1 mM, glutamina 2 mM, histidina 1 mM, hidroxilisina 100 μM, lisina 2 mM, MSX 200 μM o azaserina 50 μM. Las cajas se incubaron en condiciones de cultivo durante aproximadamente 3 semanas y se fotografiaron.

A diferencia de lo que ocurría con la estirpe silvestre, cuyo crecimiento se inhibía en todas las cajas suplementadas, el crecimiento de las estirpes mutantes del sistema Bgt sólo se inhibía cuando el suplemento era la azaserina, análogo de la glutamina, o la histidina, lo que es consistente con la posibilidad de que estos

aminoácidos se incorporen en parte por otro sistema de transporte diferente al inactivado en estas estirpes.

3.1.4. Generación y análisis de mutantes dobles de los transportadores Bgt y Nat

La identificación de los sistemas Bgt y Nat nos permitió conocer las rutas fundamentales de entrada a la célula de *Synechocystis* sp. de todos los aminoácidos excepto el glutamato. Además de un sistema de transporte para este último se podía contemplar también, como se ha indicado antes, la existencia de un segundo sistema de alta afinidad para la entrada de glutamina y de histidina, y de otro de baja afinidad para la arginina.

Sin embargo, en presencia de cualquiera de estos dos sistemas fundamentales (Bgt y Nat), otra permeasa cuya actividad contribuyera de manera minoritaria al transporte de aminoácidos podría pasar desapercibida. Se consideró interesante, por lo tanto, estudiar el transporte de aminoácidos en mutantes afectados simultáneamente en componentes de los dos sistemas, Bgt y Nat. Para generar tales mutantes, se usaron como parentales las estirpes CSX18a y CSX28a de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Montesinos *et al.*, 1997), afectados en los genes *natB* y *natA*, respectivamente, que determinan componentes del sistema de transporte de aminoácidos neutros, las cuales se transformaron con los plásmidos pCSMJ26 y pCSMJ32, que contienen los genes *bgtB* y *bgtA*, respectivamente, inactivados con la casete C.C1. Cuando se obtuvieron colonias transformantes, aisladas como resistentes a Km y Cm, se procedió como se ha descrito más arriba para la generación de los mutantes simples del sistema Bgt para conseguir clones totalmente segregados (Figura 9).

Se generaron así los siguientes mutantes: CSMJ24, afectado en los genes *natB* y *bgtB*; CSMJ26, afectado en los genes *natB* y *bgtA*; CSMJ30, afectado en *natA* y *bgtB* y CSMJ32 afectado en *natA* y *bgtA*. Se determinaron las actividades de transporte de todos estos mutantes, utilizando como sustrato un grupo de aminoácidos representativos de todas las categorías (ácidos, básicos y neutros) (Tabla 8).

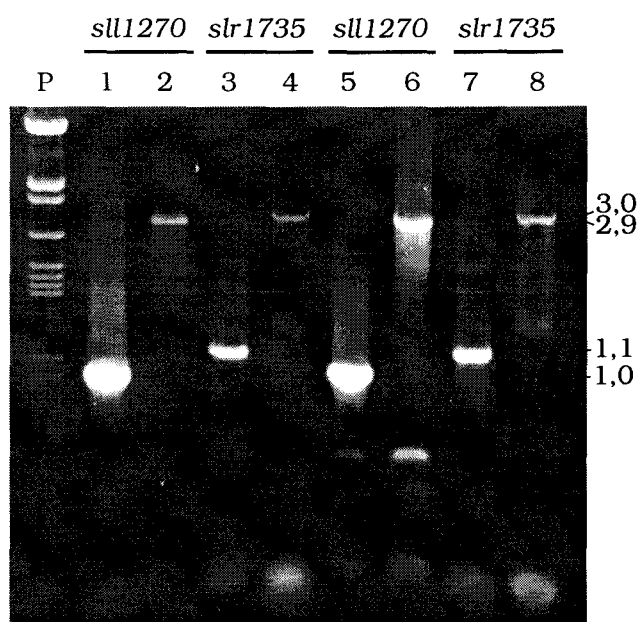


Figura 9. Estudio de la estructura de la región cromosómica conteniendo la nueva mutación introducida en las estirpes CSMJ24, CSMJ26, CSMJ30 y CSMJ32.

El DNA genómico de las estirpes mutantes CSMJ24, CSMJ26, CSMJ30 y CSMJ32 y de sus parentales (CSX18a o CSX28a) se analizó mediante amplificación por PCR de la segunda región mutada. El carril 1 corresponde a la estirpe parental CSX18a y el 2 a la CSMJ24, para ambos se utilizaron los cebadores GlnHP 1 y GlnHP 2; el carril 3 corresponde al parental CSX18a y el 4 al mutante CSMJ26 y para ambos se utilizaron los cebadores Tr 26 y Tr 27; el 5 corresponde al parental CSX28a y el 6 al CSMJ30 con GlnHP 1 y GlnHP 2; el carril 7 corresponde al parental CSX28a y el 8 a CSMJ32 con los oligonucleótidos Tr 26 y Tr 27. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas, estimado en base a dichos marcadores.

Mientras que a la concentración de glutamina utilizada (10 μ M) los mutantes del sistema Bgt presentaban actividades apreciables de transporte de glutamina, en los mutantes dobles (Bgt, Nat) esta actividad era entre un 2-3% de la actividad exhibida por la estirpe silvestre. Esto sugiere que a la actividad de transporte de glutamina observada en la estirpe silvestre contribuyen ambos sistemas (Bgt y Nat).

Tabla 8. Actividades de transporte de aminoácidos de diversos mutantes de los sistemas de transporte Nat y Bgt de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células de las estirpes indicadas, cultivadas en medio BG11, suplementado con los antibióticos correspondientes en el caso de los mutantes, se utilizaron en ensayos de transporte de los aminoácidos que se especifican en la Tabla, suministrados a concentración 10 μ M, durante 10 min (1 min para Arg y Glu). Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803 y son la media de los valores obtenidos en 2-4 ensayos independientes en el caso de los mutantes Bgt y un único ensayo (ó 2 para la glutamina) en el caso de los mutantes Nat y BgtNat.

Aa sustrato	Actividad de transporte (%)										
	Estirpe:										
	CSMJ7 (<i>bgtB</i>) ^a	CSMJ8a (<i>bgtA</i>)	CSMJ8b (<i>bgtA</i>)	CSMJ11a (<i>bgtBbgtA</i>)	CSMJ11b (<i>bgtBbgtA</i>)	CSX18a (<i>natB</i>)	CSMJ24 (<i>natBbgtB</i>)	CSMJ26 (<i>natBbgtA</i>)	CSX28a (<i>natA</i>)	CSMJ30 (<i>natAbgtB</i>)	CSMJ32 (<i>natAbgtA</i>)
Básicos											
Arg	2	2	2	3	3	113	<1	3	103	1	1
Lys	<1	<1	<1	<1	<1	131	<1	<1	90	<1	<1
Neutros											
Ala	80	101	81	97	71	2	<1	<1	2	1	<1
Gln	19	24	18	22	16	115	2	2	106	3	3
Gly	80	99	87	89	71	2	1	1	2	2	1
Pro	79	110	89	85	84	<1	<1	<1	1	<1	1
Ser	78	67	93	106	85	3	2	3	3	2	1
Ácidos											
Glu	99	74	66	97	83	81	89	95	64	85	84

^aEntre paréntesis se indica el genotipo de cada mutante.

Para hacer un estudio más detallado del transporte de glutamina, se realizaron ensayos de transporte a distintas concentraciones de este aminoácido, en la estirpe silvestre PCC 6803 y los mutantes que se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9. Actividades de transporte de glutamina de mutantes de los sistemas Nat y Bgt de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células de las estirpes indicadas, cultivadas en medio BG11, suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes, se utilizaron en ensayos de transporte de glutamina a las concentraciones que se especifican, durante 10 min. Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803 y son la media de los valores obtenidos en 2-3 ensayos independientes en el caso de los mutantes Bgt y 1-2 ensayos en el caso de los mutantes Nat y BgtNat.

Estirpe	Genotipo	Actividad de transporte (%)		
		Concentración de glutamina:		
		1 μ M	10 μ M	100 μ M
CSMJ7	<i>bgtB</i>	39	19	5
CSMJ8a	<i>bgtA</i>	50	24	5
CSMJ8b	<i>bgtA</i>	41	18	5
CSMJ11a	<i>bgtBbgtA</i>	64	22	6
CSMJ11b	<i>bgtBbgtA</i>	56	16	4
CSX18a	<i>natB</i>	64	115	103
CSMJ24	<i>natBbgtB</i>	<1	2	1
CSMJ26	<i>natBbgtA</i>	1	2	<1
CSX28a	<i>natA</i>	54	106	112
CSMJ30	<i>natAbgtB</i>	<1	3	1
CSMJ32	<i>natAbgtA</i>	1	3	<1

Los mutantes del sistema Bgt estaban más afectados en el transporte de glutamina a las concentraciones más altas (100 μ M) de este aminoácido ensayadas (véase también la Tabla 7), mientras que los mutantes del sistema Nat presentaban una alteración del transporte de glutamina sólo a la más baja concentración (1 μ M) ensayada. Los mutantes dobles carecían prácticamente de actividad de transporte de glutamina con cualquiera de las concentraciones ensayadas.

Por tanto, parece que, en términos relativos, el sistema Nat contribuye significativamente al transporte de glutamina cuando este aminoácido se encuentra a concentraciones del orden de μ M, mientras que a concentraciones mayores el transporte de glutamina es operado fundamentalmente por el sistema Bgt.

Se determinó la K_S para la glutamina de los mutantes del sistema Bgt, encontrándose un valor de 2,16 μ M en el caso de CSMJ8a (Figura 10) y de 1,16 μ M en el

de CSMJ7. Estos valores de un orden similar al descrito por Labarre *et al.* (1987) para el mutante Can1: K_S (glutamina), 10 μM . Por tanto, se puede deducir que el transporte de glutamina mediado por el sistema Nat exhibe una K_S de alrededor de 2 μM .

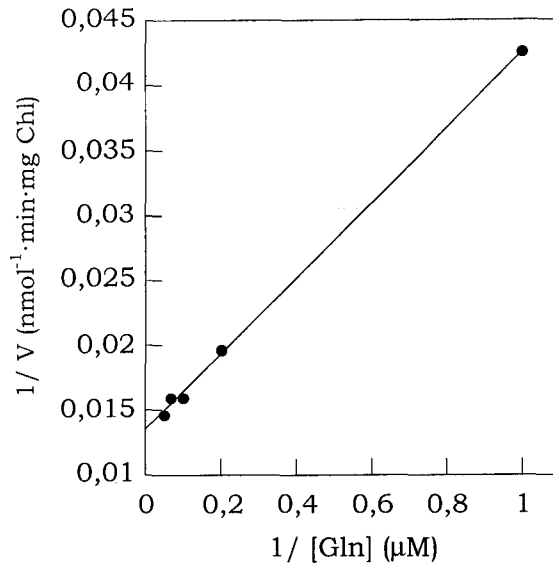


Figura 10. Cálculo de la K_S para la glutamina de la estirpe CSMJ8a.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 10 min de duración en presencia de distintas concentraciones (1, 5, 10, 15 y 20 μM) de glutamina marcada radiactivamente. v , velocidad de transporte de Gln.

La actividad de transporte de glutamato (Tabla 8) era similar en los mutantes de uno solo y de los dos sistemas, no permitiendo los resultados obtenidos adscribir un papel importante a ninguno de estos sistemas en el transporte de este aminoácido.

El aminoácido histidina, a pesar de ser considerado como un aminoácido básico al pH al que se han realizado los ensayos de transporte mostrados (pH 8,1), se comporta en parte como un aminoácido neutro debido a que el pKa del grupo imidazol de su cadena lateral es de 6,00. Para averiguar si el transporte de histidina estaba afectado en los mutantes Nat y Bgt generados, se determinaron las actividades de transporte de dicho aminoácido a concentraciones 1, 10 y 100 μM .

Tabla 10. Actividades de transporte de histidina de mutantes Nat y Bgt derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células de las estirpes indicadas, cultivadas en medio BG11, suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes, se utilizaron en ensayos de transporte de histidina a las concentraciones que se especifican, durante 10 min. Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803, que fue de 10,3 (1 μM), 60,9 (10 μM) y 421,2 (100 μM) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min, y son la media de los valores obtenidos en 2-3 ensayos independientes en el caso de los mutantes Bgt y 1-2 ensayos en el caso de los mutantes Nat y BgtNat.

Estirpe	Genotipo	Actividad de transporte (%)		
		Concentración de histidina:		
		1 μM	10 μM	100 μM
CSMJ7	<i>bgtB</i>	22	9	4
CSMJ8a	<i>bgtA</i>	29	10	5
CSMJ8b	<i>bgtA</i>	23	14	2
CSMJ11a	<i>bgtBbgtA</i>	38	11	5
CSMJ11b	<i>bgtBbgtA</i>	28	9	7
CSX18a	<i>natB</i>	41	80	87
CSMJ24	<i>natBbgtB</i>	1	2	3
CSMJ26	<i>natBbgtA</i>	1	2	3
CSX28a	<i>natA</i>	39	113	85
CSMJ30	<i>natAbgtB</i>	1	5	3
CSMJ32	<i>natAbgtA</i>	1	2	2

Como se observa en la Tabla 10, los resultados obtenidos con estos mutantes con respecto al transporte de histidina fueron similares a los encontrados para el transporte de glutamina. Los mutantes del sistema Bgt estaban más afectados a las mayores concentraciones del aminoácido y los del sistema Nat a las concentraciones menores. En los mutantes dobles la actividad de transporte de histidina era mínima. Por tanto, puede concluirse que ambos sistemas contribuyen al transporte de histidina, siendo la contribución del sistema Nat más significativa, en términos relativos, a concentraciones del orden de μM .

3.1.5. Identificación del gen *gltS* de transporte de glutamato

En el intento de identificar alguna ORF del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que determinara algún elemento de transporte de glutamato, se encontró, por comparación de secuencias, como posible candidata la ORF *slr1145* (Tabla 3). El producto hipotético de esta ORF muestra un porcentaje de identidades del 40 al 45% con la permeasa de glutamato (proteína de simporte de glutamato/sodio) de *Escherichia*

coli y de *Haemophilus influenzae* (Figura 11) y, además, es la única ORF de *Synechocystis* sp. con un grado de similitud apreciable a un transportador específico de glutamato.

GltS-Ecoli	~~MFHLDTLA	TLVAATLTLL	LGRKLVHSVS	FLKKYTIPEP	VAGGLLVALA	50
GltS-Hinfl	~MSYTFSTYE	TLALASLVLL	LGYFLVKRIN	VLKTFNIPEP	VVGGFIVAIG	
<i>slr1145-6803</i>	METIQFNIRQ	TIIVAILVLY	IGKYLTKKIK	FLOQFNIPDA	VSGGVLASLF	
Consenso	-----	T---A-L-L-	-G--L-----	-L----IP--	V-GG-----	
GltS-Ecoli	LLVLKKSMTGW	EVNFDMSLRD	PLMLAFFATI	GLNANIASLR	AGGRVVGIFL	100
GltS-Hinfl	LLIWHKIDGT	SFNFDKNLQT	TMMLVFFTSI	GLSANFSRLI	KGGKPLVVFL	
<i>slr1145-6803</i>	FGLIYGIFRT	EVAFNFPIRD	AFLIIFFTCI	GLSSKLVLL	QGGKPLLILL	
Consenso	-----	---F-----	-----FF--I	GL-----L-	-GG-----L	
GltS-Ecoli	IVVVGLLVMQ	NAIGIGMASL	LGLDPLMGLL	AGSITLSGGH	GTGAAWSKLF	150
GltS-Hinfl	FIAALLIFGQ	NVIGIASSMA	LGHPAYGLL	AGSVTLTGGH	GTGAAWADTF	
<i>slr1145-6803</i>	ATAVSFLVIQ	NFVGVGMASL	LGQALPVGLL	SGSISLSGGH	GTATAWSPVF	
Consenso	-----Q	N--G-----	LG-----GLL	-GS--L-GGH	GT--AW---F	
GltS-Ecoli	IERYGFTNAT	EVAMACATFG	LVLGGLIGGP	VARYLVKHST	TPNGIPDDQ.	200
GltS-Hinfl	AHQFNLOGAT	EIAIACATFG	LVFGGIIGGP	VARFLLNRQK	QGENPENDEV	
<i>slr1145-6803</i>	YDNHGIRNAS	EIAIACATFG	LVFGGIVGGP	IAKFLIIRNK	LE...PDCDT	
Consenso	-----A-	E-A-ACATFG	LV-GG--GGP	-A--L-----	-----	
GltS-Ecoli	.EVPTAFEKP	DVGRMITSLV	LIETIALIAI	CLTVGKIVAQ	LLAGTAFELP	250
GltS-Hinfl	DDIQEAFEHP	TYKRKITARS	LIETIAMISV	CLLIGQYLDV	QTKGTALQLP	
<i>slr1145-6803</i>	KDLTIGIRRD	QDNVQIDYNT	MLHTILVIGV	TIGLGYEIND	LVAKLGLMLP	
Consenso	-----	-----I----	---TI--I--	----G-----	-----LP	
GltS-Ecoli	TFVCVLFVGV	ILSNGLSIMG	F...YRVFER	AVSVLGNVSL	SIFLAMALMG	300
GltS-Hinfl	TFVWCLFTGV	IVRNILTNIIF	R...FQVAES	AIDVLGSVGL	SIFLAIALMS	
<i>slr1145-6803</i>	AFVSCLLAGI	VLNTIPLAF	KKFPWPAETP	SLALISDVSL	GLFLAISLMS	
Consenso	-FV--L--G-	---N-----	-----	-----V-L	--FLA--LM-	
GltS-Ecoli	LKLWELASLA	LPMLAILVVQ	TIFMALYAIF	VTWRMMGKNY	DAAVLAAGHC	350
GltS-Hinfl	LRLWELAGLA	IDVLIVLAIQ	VAFMAAFAIF	ITYRAMGKDY	DAVVLSAGHC	
<i>slr1145-6803</i>	LQLWTLADIG	GVIALILLVQ	FMATVLYSIA	VVFPLMGRDY	NAAVVCSGYS	
Consenso	L-LW-LA---	-----L--Q	-----I-	-----MG--Y	-A-V---G--	
GltS-Ecoli	GFGLGATPTA	IANMQAITER	FGPSHMAFLV	VPMVGAFID	IVNALVIKL.	400
GltS-Hinfl	GFGLGATPTA	IANMQAVTSR	FGPSHKAFIL	VPMVGAFID	LINAALLKVS	
<i>slr1145-6803</i>	GLTLGATPTA	IANMTAVTEK	FGAAPQAFIV	VPLVGAFID	IANAFVIQQF	
Consenso	G--LGATPTA	IANM-A-T--	FG----AF--	VP-VGAFID	--NA-----	
GltS-Ecoli	YLMLPIFAG	409				
GltS-Hinfl	FAVVNILA~					
<i>slr1145-6803</i>	LNFLG----					
Consenso	-----					

Figura 11. Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto de la ORF *slr1145* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) con la de las proteínas GltS de *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli*.

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

Con el fin de clonar dicha ORF se diseñaron como cebadores los oligonucleótidos GltS 1 y GltS 2 (ver apartado 2.7.14 de materiales y métodos). Usando dichos cebadores y, como molde, DNA de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se llevó a cabo una reacción de PCR, de la cual se obtuvo un único fragmento, de aproximadamente 1 kb, que contenía la mayor parte de esta ORF. Dicho fragmento se clonó en el vector pGEM-T, originándose el plásmido pCSMJ22 (Tabla 4). Este plásmido se digirió con las endonucleasas de restricción *SacII* y *HincII* y el fragmento correspondiente a su inserto se clonó en el vector pBluescript SK (+) cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante, denominado pCSMJ23, se digirió con la enzima de restricción *NcoI*, para la que este plásmido presenta una única diana localizada en el inserto. Tras tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, se introdujo en ese sitio la casete C.K3 (de aproximadamente 1,5 kb), generándose así el plásmido pCSMJ24a con la C.K3 insertada en la misma orientación que la ORF.

Se transformó la estirpe PCC 6803 con el plásmido pCSMJ24a con el fin de reemplazar la ORF *slr1145* original por la versión mutada contenida en el mismo. Se obtuvieron colonias resistentes a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Km, que se sembraron para volver a obtener colonias aisladas. Dichas colonias se cultivaron en medio BG11 suplementado con Km a concentraciones de entre 30 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y, tras unos días de incubación en estas condiciones, se aisló el DNA genómico de algunos de estos cultivos para comprobar la estructura cromosómica mediante PCR y análisis de Southern.

Para el análisis por PCR se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos GltS 1 y GltS 2 usados en la clonación de la ORF y, como molde, DNA total aislado de los mutantes y de la estirpe silvestre. El resultado (Figura 12A) mostraba, en el caso del mutante, una banda única a una altura correspondiente a un tamaño suma del de la ORF más el de la casete (aproximadamente 2,5 kb) y ausencia total de banda a la altura de la correspondiente a la ORF (aproximadamente 1 kb), lo cual sugería la completa segregación de la mutación. La estirpe mutante que se había generado, y de la cual se había comprobado su estado de segregación, se denominó CSMJ6a. Para corroborar el resultado anterior, se llevó a cabo un análisis de Southern usando como sonda un fragmento de la ORF *slr1145*. Se observó (Figura 12B) un cambio de movilidad del fragmento de DNA que hibridaba con dicha sonda en la estirpe mutante con respecto a la estirpe silvestre, cambio que correspondía al tamaño de la casete.

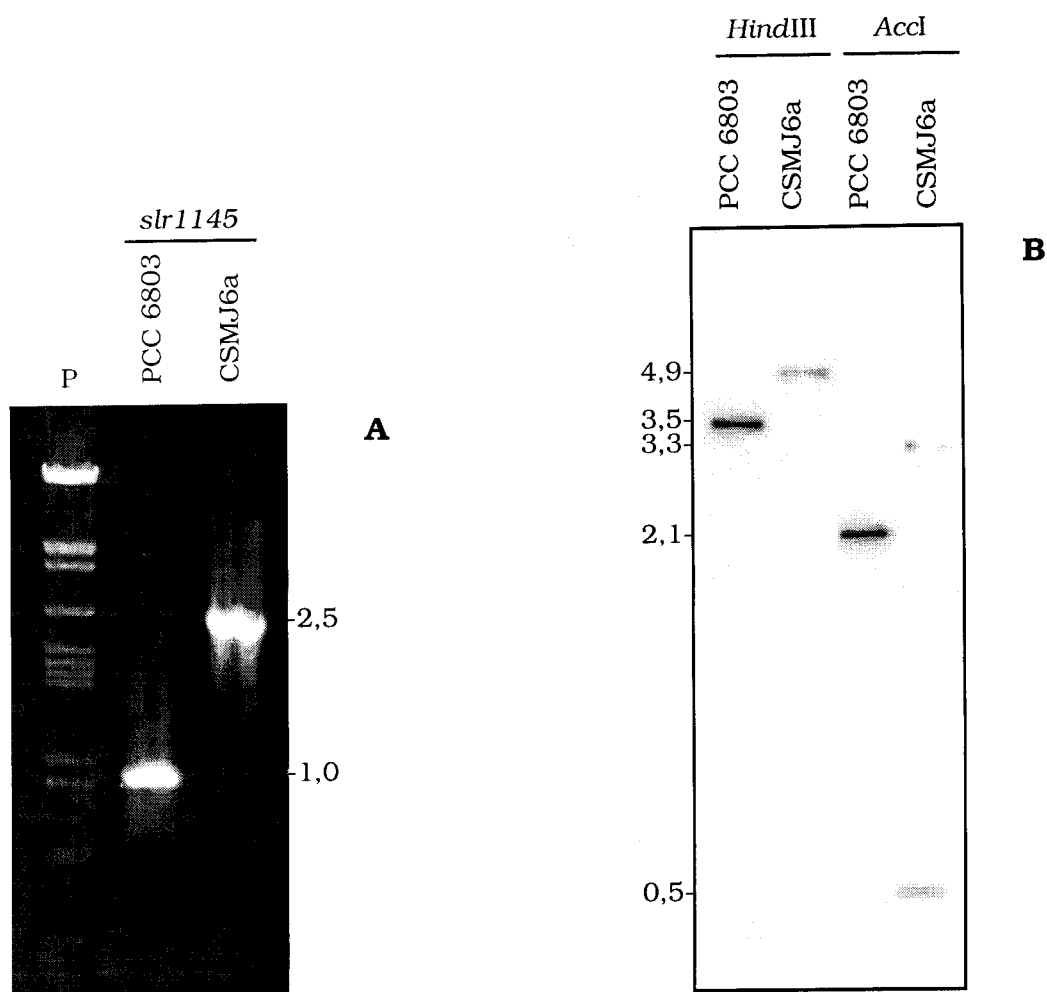


Figura 12. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en la estirpe CSMJ6a.

A- El DNA genómico de la estirpe mutante CSMJ6a y de la estirpe silvestre PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores los oligonucleótidos GltS 1 y GltS 2. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas, estimado en base a dichos marcadores.

B- Se digirió DNA total de las estirpes PCC 6803 y CSMJ6a con las enzimas de restricción *HindIII* o con *AccI*. Se llevó a cabo un análisis de Southern en condiciones restrictivas utilizando como sonda un fragmento de la ORF *str1145* obtenido mediante PCR empleando como molde el plásmido pCSMJ22 y como cebadores los oligonucleótidos GltS 1 y GltS 2. Usando como marcador el DNA del fago λ digerido con *ClaI* se estimaron los tamaños (en kb) correspondientes a las bandas, los cuales se indican a la izquierda de la figura.

Se determinaron las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSMJ6a (Tabla 11). Cuando el aminoácido utilizado como sustrato era neutro o básico no se observaba ninguna diferencia que pudiera considerarse significativa con respecto a las actividades exhibidas por la estirpe silvestre. En los ensayos en los cuales el sustrato era el glutamato, el transporte se veía reducido en un 32% en la estirpe

CSMJ6a con respecto a la actividad de la estirpe silvestre (Tabla 11). Cuando se utilizó una concentración de glutamato de 1 μM , el transporte en el mutante fue un 44% menor que el observado en la estirpe silvestre (Tabla 12).

Tabla 11. Actividades de transporte de aminoácidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso del mutante, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μM , de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos que se presentan son la media de los valores obtenidos en 2 ó, en el caso del glutamato, 7 ensayos independientes.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min)	
	Estirpe:	
	PCC6803	CSMJ6a
Básicos		
Arg	6057,2	5979,9 (99%) ^a
Lys	614,6	675,9 (110%)
Neutros		
Ala	112,2	85,3 (76%)
Gln	56,8	65,3 (115%)
Gly	102,4	88,1 (86%)
Pro	56,1	44,1 (79%)
Ser	63,4	58,7 (93%)
Ácidos		
Glu	762,0	519,0 (68%)

^aLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

Con objeto de investigar otras condiciones de cultivo en las que el transporte de glutamato pudiera expresarse de forma diferente permitiendo una mejor caracterización del mutante, se incubaron las células de éste y de la estirpe silvestre en medio carente de fuente de nitrógeno durante diferentes periodos de tiempo (Tabla 12). La actividad de transporte de glutamato disminuía notablemente en las células sometidas a un ayuno extremo de nitrógeno, sin que ésto permitiera observar un mayor efecto de la mutación de la ORF *slr1145*.

Tabla 12. Actividades de transporte de glutamato de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a.

Células cultivadas en medio BG11 suplementado con Km en el caso del mutante, recogidas, lavadas e incubadas en medio BG11₀ durante los tiempos indicados, se sometieron a ensayos de transporte de glutamato, suministrado a las concentraciones que se especifican, de 1 min de duración.

Condiciones de cultivo	Estirpe	Actividad de transporte ^a (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)		
		Concentración de glutamato:		
		1 μM	10 μM	100 μM
BG11	PCC6803	85 ± 27	762 ± 203	3309 ± 278
	CSMJ6a	48 ± 8 (56%) ^b	519 ± 97 (68%)	2275 ± 412 (69%)
BG11 ₀ (13h)	PCC6803	116	960	n.d. ^c
	CSMJ6a	52 (45%)	417 (43%)	n.d.
BG11 ₀ (48h)	PCC6803	88	412	2706
	CSMJ6a	26 (29%)	342 (83%)	1526 (56%)
BG11 ₀ (15 días)	PCC6803	12	117	783
	CSMJ6a	10 (83%)	75 (64%)	433 (55%)

^aLos datos de transporte con células cultivadas en BG11 son la media y desviación típica de 4-7 experimentos independientes, mientras que los de las células incubadas en BG11₀ proceden de un único experimento.

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

^cn.d.: no determinado.

El hecho de que el transportador de glutamato GltS con que muestra homología la proteína deducida de la ORF *slr1145* que estábamos estudiando fuera una permeasa que media un simporte glutamato/sodio nos hizo plantearnos el estudio del transporte de glutamato en *Synechocystis* sp. en presencia de distintas concentraciones de sodio. Como se pone de manifiesto en la Figura 13, el transporte de glutamato detectado en *Synechocystis* sp. es dependiente de la presencia de sodio en el medio, por lo que analizamos el efecto de la mutación en la ORF *slr1145* en el transporte de glutamato en presencia y en ausencia de sodio. Como se observa en la Tabla 13, la ORF *slr1145* es responsable de una actividad de transporte de glutamato dependiente de sodio.

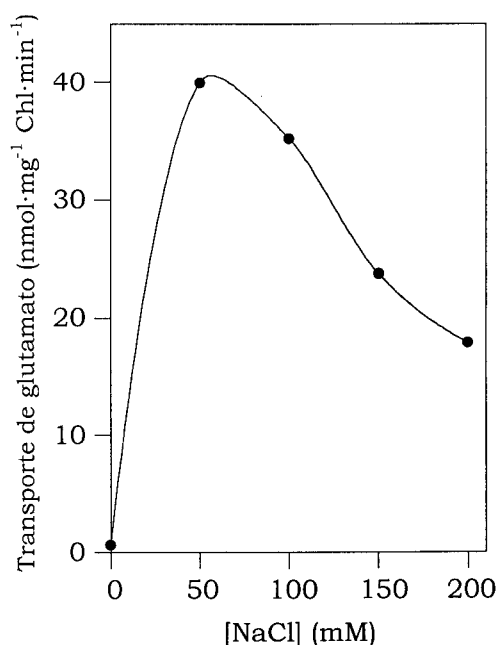


Figura 13. Transporte de glutamato en *Synechocystis* sp. PCC 6803 en presencia de distintas concentraciones de sodio.

Células cultivadas en medio BG11 se sometieron a ensayos de transporte de glutamato suministrado a concentración 10 μ M, de 10 min de duración en tampón Tricina-KOH 25 mM (pH 8,1). Un minuto antes del comienzo del ensayo de transporte se añadía a la suspensión celular, cuando se indica, NaCl a concentración 50, 100, 150 ó 200 mM.

Tabla 13. Actividades de transporte de glutamato de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de la estirpe mutante CSMJ6a en presencia de diferentes concentraciones de NaCl.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso del mutante, se sometieron a ensayos de transporte de glutamato suministrado a concentración 10 μ M, de 10 min de duración, en tampón Tricina-KOH 25 mM (pH 8,1). Un minuto antes del comienzo del ensayo de transporte se añadía a la suspensión celular, cuando se indica, NaCl a concentración 17,5 ó 50 mM. Los datos presentados son la media de 7 determinaciones con células de 4 cultivos independientes.

[NaCl] (mM)	Transporte de glutamato (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)		Actividad GltS estimada ^a (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)
	PCC6803	CSMJ6a	
0	16,3	1,2	15,1
17,5	297,8	188,4	109,4
50	371,9	192,4	179,5

^aDiferencia entre la actividad de transporte en las estirpes PCC 6803 y CSMJ6a.

Proponemos que la ORF *slr1145* corresponde a un gen al que denominaremos, por homología con el de *E. coli*, *gltS*, que determina un transportador de glutamato dependiente de sodio. Sin embargo, *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha de expresar al menos otro sistema de transporte para este aminoácido, también dependiente de sodio, responsable de la actividad remanente en el mutante CSMJ6a.

3.1.6. Identificación de un nuevo sistema de transporte de glutamato

Las ORFs *sll1102* y *sll1103* determinan proteínas homólogas a los componentes de la permeasa tipo TRAP de *Rhodobacter capsulatus* (Tabla 3). Al encontrarse agrupadas con la ORF *sll1104* (Figura 14) que determina una proteína similar, sobre todo, a proteínas de unión de glutamina, pero también a otras de unión de glutamina/glutamato/asparragina/aspartato, se decidió inactivar estas ORFs para investigar su posible participación en el transporte de aminoácidos.

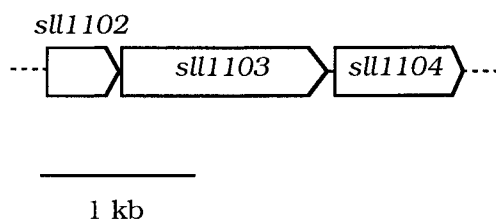


Figura 14. Representación esquemática de la disposición en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de las ORFs *sll1102*, *sll1103* y *sll1104* (Kaneko *et al.*, 1996). Entre la ORF *sll1102* y la *sll1103* no hay ningún nucleótido y entre la ORF *sll1103* y la *sll1104* 18 pb. El perfil de hidrofobicidad mostrado por la secuencia de aminoácidos deducida de la ORF *sll1102* mostraba tres posibles dominios de expansión de membrana y el de la *sll1103* catorce.

Al comienzo de este estudio, se disponía en el laboratorio de los plásmidos pCSX67 y pCSX68 (M.L. Montesinos, sin publicar). El plásmido pCSX67 se había originado a partir del plásmido pCSX65 que contenía un fragmento de DNA de 1,4 kb amplificado con los oligonucleótidos Trap 1 y Trap 2 (ver materiales y métodos), conteniendo la ORF *sll1102* entera y la mayor parte de la ORF *sll1103*, clonada en pGEM-T. Posteriormente, el plásmido pCSX65 se digirió con la endonucleasa de restricción *Bam*HI para la cual hay dos dianas de restricción en el inserto, liberándose así un fragmento de 370 pb, en lugar del cual se insertó la casete C.K3 (materiales y métodos), interrumpiendo al mismo tiempo ambas ORFs. Por otra parte, el plásmido pCSX68 se había originado a partir del plásmido pCSX66 que contenía un fragmento de DNA de 1,1 kb amplificado por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos Trap 3 y Trap 4 (ver materiales y métodos), conteniendo de esta forma casi la totalidad de la ORF *sll1104* clonada en pGEM-T. Se digirió pCSX66 con la endonucleasa *Xba*I que posee un único sitio de restricción situado en este inserto y en este lugar se insertó la casete C.K3 (materiales y métodos).

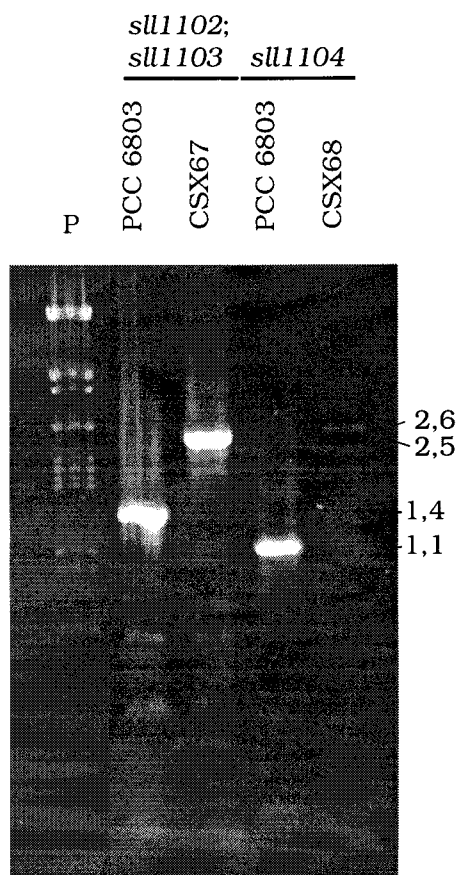


Figura 15. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSX67 y CSX68.

El DNA genómico de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68 y de la estirpe silvestre PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores los oligonucleótidos Trap 1 y Trap 2 en el caso de CSX67 y Trap 3 y Trap 4 en el de CSX68. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *Cla*I (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a algunas bandas, estimado en base a dichos marcadores.

La estirpe silvestre PCC 6803 se transformó con los plásmidos pCSX67 y pCSX68, obteniéndose colonias resistentes a la Km. Se aislaron colonias a partir de las obtenidas en las transformaciones y, a partir de ellas, se inocularon cultivos en medio líquido suplementado con Km a concentraciones de entre 30 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De algunos de éstos se aisló DNA total para comprobar el estado de segregación mediante PCR, seleccionándose un clon procedente de cada una de las transformaciones en el que tras la amplificación no aparecía ninguna banda a la altura que correspondería al fragmento sin inserción, pero sí a la altura correspondiente al fragmento con la casete (y menos la delección de 370 pb en el caso del transformante del plásmido pCSX67) (Figura 15). Se denominó CSX67 al mutante en el que se habían inactivado las ORFs *sll1102* y *sll1103* y CSX68 al mutante con la ORF *sll1104* inactivada.

Se realizaron ensayos de transporte, utilizando como sustrato distintos aminoácidos a concentración 10 μ M. En ninguno de los casos se observó una alteración notable de la actividad de transporte del mutante CSX67 ni del CSX68 con respecto a la actividad mostrada por la estirpe silvestre (Tabla 14).

Tabla 14. Actividades de transporte de aminoácidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos son la media de los valores obtenidos en 2-4 ensayos independientes en el caso de los mutantes y 4-6 ensayos en el del silvestre. En el caso concreto del glutamato, se llevaron a cabo 2 determinaciones con cada mutante.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)		
	Estirpe:		
	PCC6803	CSX67 (<i>sll1102</i> , <i>sll1103</i>) ^a	CSX68 (<i>sll1104</i>)
Básicos			
Arg	5407,7	5741,0 (106%) ^b	5102,0 (94%)
Lys	598,5	505,7 (84%)	503,6 (84%)
Neutros			
Ala	103,5	92,5 (89%)	110,9 (107%)
Gln	66,8	68,8 (103%)	63,0 (94%)
Gly	85,4	80,3 (94%)	81,3 (95%)
Pro	51,7	60,5 (117%)	64,8 (125%)
Ser	70,6	59,9 (85%)	61,2 (87%)
Leu	66,1	51,8 (78%)	48,6 (73%)
Ácidos			
Glu	649,4	574,0 (88%)	653,0 (101%)
Asp	5,0	3,7 (74%)	4,1 (82%)

^aSe indica entre paréntesis las ORFs inactivadas en cada una de las estirpes mutantes.

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

Como la ORF *sll1104* determina hipotéticamente una proteína homóloga a proteínas de unión de glutamina, se realizaron también ensayos de transporte con glutamina a distintas concentraciones entre 1 y 200 μ M como sustrato (Tabla 15). Con todas las concentraciones ensayadas, el porcentaje de actividad de transporte de glutamina con respecto a la actividad de la estirpe silvestre se encontraba entre el 72 y el 153%, por lo que no podemos concluir que los productos de estas ORFs estén implicados en un sistema de transporte de glutamina.

Tabla 15. Actividades de transporte de glutamina de la estirpe silvestre *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de glutamina, suministrada a las concentraciones que se indican, de 10 min de duración. Los datos son los valores obtenidos en un único experimento.

[Gln] (μM)	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min)		
	Estirpe:		
	PCC6803	CSX67 (<i>sll1102, sll1103</i>) ^a	CSX68 (<i>sll1104</i>)
1	9,6	8,9 (93%) ^b	7,3 (76%)
2	27,3	31,0 (114%)	29,0 (106%)
10	68,2	65,0 (95%)	64,5 (95%)
20	130,9	200,5 (153%)	129,7 (99%)
100	623,9	447,1 (72%)	532,3 (85%)
200	945,4	1276,3 (135%)	1137,7 (120%)

^aSe indica entre paréntesis la ORF inactivada en cada una de las estirpes mutantes

^bLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

Para investigar si dichas ORFs podrían estar implicadas en el transporte de un sustrato diferente de un aminoácido, también se realizaron ensayos de transporte utilizando 10 μM de α -cetoglutarato marcado con ^{14}C , pero ni el mutante CSX67 ni el CSX68 mostraron valores de actividad de transporte para dicho sustrato significativamente distintos de los valores de la estirpe silvestre (Tabla 16).

Tabla 16. Actividades de transporte de α -cetoglutarato de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de α -cetoglutarato, suministrado a concentración 10 μM , de 10 min de duración. Los datos que se presentan corresponden a un único experimento.

Estirpe:	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min)
PCC6803	1,9
CSX67	2,0
CSX68	1,8

A pesar del resultado negativo mostrado en la Tabla 14, con objeto de determinar si los componentes de este sistema estaban implicados en el transporte de glutamato dependiente de sodio que quedaba remante en el mutante *gltS*, se realizaron



ensayos de transporte de dicho aminoácido en presencia de distintas concentraciones de NaCl (Tabla 17).

Tabla 17. Actividades de transporte de glutamato de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSX67 y CSX68.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de glutamato suministrado a concentración 10 μ M, de 10 min de duración en tampón Tricina-KOH 25 mM (pH 8,1). Un minuto antes de comenzar el ensayo de transporte se añadía a la suspensión celular, cuando se indica, NaCl a concentración 17,5 ó 50 mM. Los datos presentados son la media de 7 determinaciones con células de 4 cultivos independientes.

[NaCl] (mM)	Transporte de glutamato (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)			Actividad estimada ^a (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)	
	PCC6803	CSX67	CSX68	Actividad dependiente del componente de membrana	Actividad dependiente del componente periplásmico
0	16,3	1,5	1,4	14,8	14,9
17,5	297,8	216,4	214,8	81,4	83,0
50	371,9	213,5	256,1	158,4	115,8

^aDiferencia entre la actividad de transporte en las estirpes PCC 6803 y CSX67 o CSX68.

Ambos mutantes resultaron estar afectados en el transporte de glutamato dependiente de sodio. Hemos denominado a las ORFs *sll1102*, *sll1103* y *sll1104* como *gtrA*, *gtrB* y *gtrC*, respectivamente (*gtr* deriva de "glutamate" y "tripartite" por su homología con el sistema TRAP).

3.1.7. Inactivación de las ORFs *slr0401* y *slr1257*

Las ORFs *slr0401* y *slr1257* se estudiaron por presentar sus secuencias de aminoácidos deducidas homología con proteínas pertenecientes a transportadores de membrana de otros organismos o del propio *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tabla 3).

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación por PCR de las ORFs *slr0401* y *slr1257* se especifican en materiales y métodos. Como molde se utilizó DNA genómico de *Synechocystis* sp. y como resultado de las amplificaciones se obtuvieron fragmentos de DNA de aproximadamente 950 pb, que se clonaron en el vector pGEM-T, generándose los plásmidos pCSMJ39 y pCSMJ42 (Tabla 4), que contenían la mayor parte de las ORFs *slr0401* y *slr1257*, respectivamente. Dichos plásmidos se digirieron con endonucleasas de restricción para las que se encontraba un solo sitio de corte en cada uno de los plásmidos, situados en los insertos, introduciéndose en cada uno de estos sitios la casete de resistencia C.K3. Así, se generaron los plásmidos pCSMJ43a, pCSMJ43b y pCSMJ46b (Tabla 4).

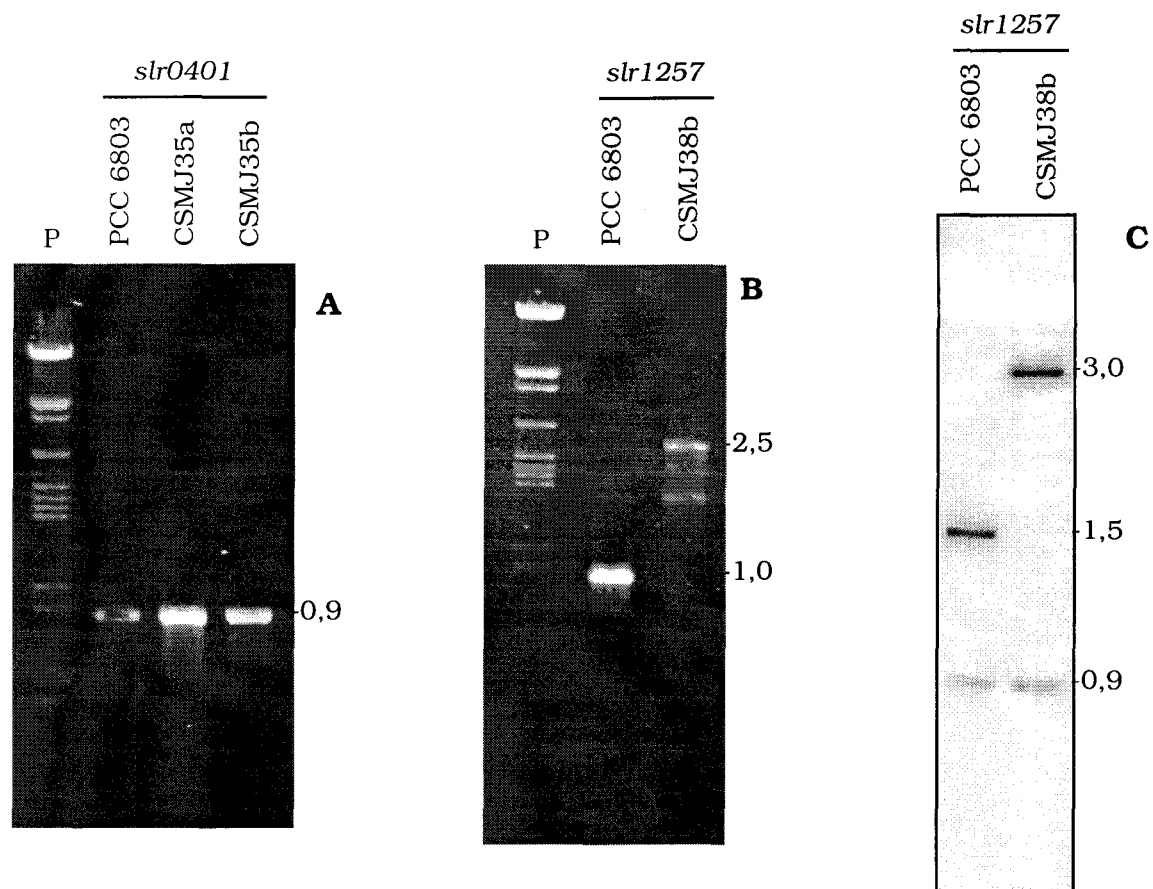


Figura 16. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ35a, CSMJ35b y CSMJ38b.

A- El DNA genómico de las estirpes mutantes CSMJ35a y CSMJ35b y de la estirpe silvestre PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores los oligonucleótidos Tr 28 y Tr 29. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *Cla*I (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas, estimado en base a dichos marcadores.

B- El DNA genómico de la estirpe mutante CSMJ38b y de la estirpe silvestre PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores los oligonucleótidos Tr 34 y Tr 35. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *Cla*I (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas, estimado en base a dichos marcadores.

C- DNA total de las estirpes PCC 6803 y CSMJ38b se digirió con la enzima de restricción *Bst*XI. Se realizaron hibridaciones en condiciones restrictivas utilizando como sonda un fragmento de la ORF *slr1257* obtenido mediante PCR empleando como molde el plásmido pCSMJ42 y como cebadores los oligonucleótidos Tr 34 y Tr 35. Usando como marcador el DNA del fago λ digerido con *Cla*I se estimaron los tamaños correspondientes a las bandas, indicados en kb a la derecha de la figura.

Se transformó la estirpe silvestre PCC 6803 con estos plásmidos y se seleccionaron clones resistentes a la Km. De la misma forma indicada en los apartados anteriores (utilizando Km 30-300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), se procedió con el fin de obtener clones segregados para cada una de las mutaciones. De este modo, se generaron las estirpes mutantes CSMJ35a (*slr0401::C.K3*), CSMJ35b (*slr0401::C.K3*) y CSMJ38b (*slr1257::C.K3*).

La estructura cromosómica de los mutantes se comprobó mediante PCR y, en el caso del mutante CSMJ38b, también por análisis de Southern (Figura 16). En el caso de los mutantes CSMJ35a y CSMJ35b no fue posible la obtención de clones mutantes cromosómicamente homogéneos a pesar de utilizarse concentraciones de Km de hasta 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo que sugiere que el producto de la ORF *slr0401* sea esencial, al menos en las condiciones de cultivo empleadas.

Se realizaron ensayos de transporte de aminoácidos con el mutante CSMJ38b con el fin de estudiar si la ORF inactivada en él determinaba una proteína implicada en el transporte de algún o algunos aminoácidos en *Synechocystis* sp. (Tabla 18).

Tabla 18. Actividades de transporte de aminoácidos de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y la estirpe mutante CSMJ38b.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso del mutante, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μM , de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos son la media de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min)	
	Estirpe:	
	PCC6803	CSMJ38b
Básicos		
Arg	4358,0	4171,0 (96%) ^a
Lys	598,3	560,5 (94%)
Neutros		
Ala	139,6	136,9 (98%)
Gln	97,0	82,9 (85%)
Gly	115,6	111,5 (96%)
Pro	63,2	73,7 (117%)
Ser	75,2	71,0 (94%)
Leu	69,7	50,6 (73%)
Ácidos		
Glu	611,0	516,0 (84%)
Asp	5,2	3,0 (58%)

^aLos datos que se presentan entre paréntesis son el porcentaje de la actividad de transporte con respecto a la mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803.

La estirpe mutante CSMJ38b mostró actividades de transporte de aminoácidos similares a las de la estirpe silvestre, descartándose de este modo la posibilidad de que la ORF *slr1257* determinara una proteína necesaria para el transporte de los aminoácidos ensayados (como se ha mencionado en el apartado 3.1.2, la determinación del transporte de aspartato está sometida a una alta variabilidad).

3.2. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

Una vez identificados los transportadores de aminoácidos descritos en el apartado anterior, nos interesamos por el catabolismo de la arginina, un aminoácido que sirve como fuente de nitrógeno para el crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Flores y Muro-Pastor, 1990). En el curso de estos estudios, se hizo evidente que la estirpe PCC 6803 podía metabolizar también la prolina, por lo que se investigó la ruta catabólica para la misma en esta cianobacteria.

3.2.1. Catabolismo de la prolina

3.2.1.1. Generación de un mutante *putA*

Se buscó por homología de secuencia la existencia en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de alguna ORF que determinara una proteína que pudiera ser responsable de la metabolización de la prolina. Se seleccionó la ORF *sll1561*, que determinaría una proteína de 990 aa con un 49% de identidades en su mitad C-terminal con la Δ^1 pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* y un 34% de identidades, en toda su extensión, con la proteína PutA (prolina oxidasa) de *Escherichia coli*.

La estrategia que se siguió para la clonación de esta ORF, al igual que para las demás estudiadas en referencia al catabolismo de aminoácidos, fue similar a la seguida para el análisis de las ORFs implicadas en los sistemas de transporte de aminoácidos, descrita en páginas anteriores. Se llevó a cabo una reacción de PCR usando como molde DNA de la estirpe PCC 6803 y como cebadores los oligonucleótidos PutA 1 y PutA 2 (ver materiales y métodos), obteniéndose como resultado un fragmento de DNA de 960 pb que se clonó en el vector pGEM-T. El plásmido resultante, que se denominó pCSMJ33 (Tabla 19), se digirió con la enzima de restricción *SmaI* y en el sitio abierto se insertó la casete C.C1. Se transformó la estirpe silvestre PCC 6803 con esta construcción (plásmido pCSMJ35) y se seleccionaron colonias resistentes a $10 \mu\text{g Cm}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabla 19. Plásmidos construidos para la inactivación insercional de la ORF *sll1561* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSMJ33	Fragmento de 960 pb de la ORF <i>sll1561</i> , amplificado con los cebadores PutA 1 y PutA 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ35	Plásmido que contiene la ORF <i>sll1561</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ33.

Algunas de las colonias que se obtuvieron se cultivaron en medio líquido BG11 suplementado con Cm a concentraciones de entre 10 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A partir de algunos de estos clones, capaces de resistir las concentraciones más altas de Cm utilizadas, se aislaron nuevamente colonias y se comprobó, mediante análisis de Southern, la estructura cromosómica en la región mutada en células de cultivos derivados de dichas colonias. Se seleccionó un clon, que se encontraba correctamente segregado, al que se denominó CSMJ15 (Figura 17).

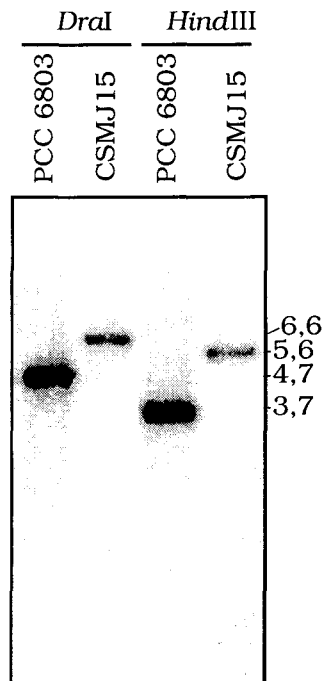


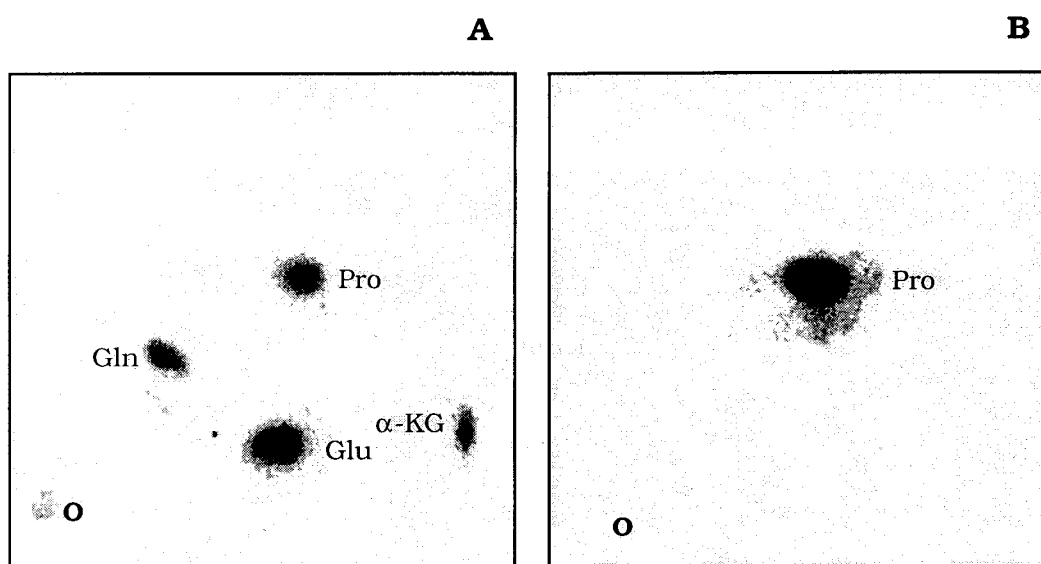
Figura 17. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en la estirpe CSMJ15.

DNA total de las estirpes PCC 6803 y CSMJ15 se digirió con las enzimas de restricción *DraI* o *HindIII*. Se realizaron hibridaciones en condiciones restrictivas utilizando como sonda un fragmento de la ORF *sll1561* obtenido mediante PCR empleando como molde el plásmido pCSMJ33 y como cebadores los oligonucleótidos PutA 1 y PutA 2. Usando como marcador el DNA del fago λ digerido con *ClaI* se estimaron los tamaños correspondientes a las bandas, los cuales se indican (en kb) a la derecha de la figura.

3.2.1.2. Destino metabólico de la [¹⁴C]prolina

Para comprobar si la ORF *sll1561* clonada determinaba una enzima implicada en el catabolismo de la prolina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en los que células de las estirpes PCC 6803 y CSMJ15 se suplementaban con [¹⁴C]prolina. Tras 15 minutos de ensayo, en el caso de PCC 6803 se encontraron además de la prolina tres productos metabólicos que aparecían marcados (Figura 18). Dos de estos productos correspondían, según se comprobó por co-cromatografía con aminoácidos estables y posterior revelado con ninhidrina, a los aminoácidos glutamato

y glutamina, mientras que la tercera mancha podría corresponder a α -cetoglutarato (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2000). No se obtuvo ningún producto marcado generado a partir de la [^{14}C]prolina en la estirpe CSMJ15, lo cual confirmaba el papel de la ORF *sll1561* en el catabolismo de la prolina, interviniendo su producto en la formación del glutamato que posteriormente, por acción de la glutamina sintetasa, se transformaría en glutamina. Por otra parte, la acción de transaminasas sobre el [^{14}C]glutamato liberaría α -cetoglutarato marcado. Estos resultados confirman la identidad de la *sll1561* como el gen *putA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.



Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):			
	Pro	Glu	Gln	α -KG
PCC6803	17,7	34,5	13,7	34,0
CSMJ15	100,0	0,0	0,0	0,0

Figura 18. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]prolina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ15.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ15 (B), cultivadas en medio BG11, se incubaron durante 15 min a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,1 \mu\text{M}$ de [^{14}C]prolina. Los metabolitos celulares producidos se extrajeron y analizaron por TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos. La figura mostrada corresponde a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los metabolitos identificados fueron: prolina (Pro), glutamato (Glu), glutamina (Gln) y, posiblemente, α -cetoglutarato (α -KG). \bullet señala el origen de la cromatografía. Se incluye una tabla con la cuantificación de la radiactividad acumulada en cada metabolito expresada como el porcentaje con respecto a la suma total de radiactividad en metabolitos solubles (el valor del α -cetoglutarato se corrigió según el porcentaje de descomposición de este compuesto en el curso de la cromatografía; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2000).

3.2.1.3. Crecimiento de la estirpe mutante CSMJ15

Se analizó también la capacidad de las estirpes PCC 6803 y CSMJ15 de crecer con prolina como única fuente de nitrógeno. Para ello se realizaron ensayos de crecimiento en matraces con medio BG11, BG11 + 5 mM prolina, BG11₀ y BG11₀ + 5 mM prolina. El crecimiento en medio BG11, ya fuera solo o suplementado con prolina, era idéntico en las dos estirpes analizadas; por el contrario, en BG11₀ con prolina, se observaba crecimiento con la estirpe silvestre pero no con el mutante (Figura 19). Por lo tanto, se deduce que la prolina, aunque haya que definirla como una fuente pobre de nitrógeno, es capaz de permitir el crecimiento de la estirpe PCC 6803. El hecho de que no ocurra lo mismo en la estirpe CSMJ15 (mutante insercional en *putA*) es consistente con los resultados del apartado anterior que indicaron que este gen determina una proteína implicada en el metabolismo de dicho aminoácido.

Estirpe:

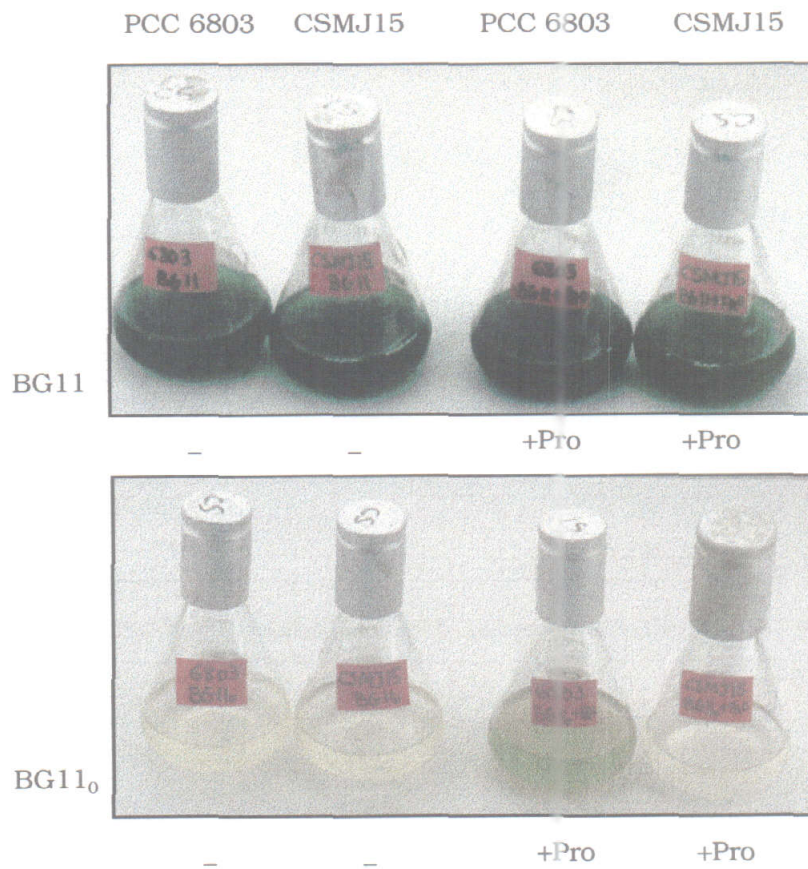


Figura 19. Crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y CSMJ15 con nitrato y/o prolina como fuente de nitrógeno.

Las estirpes se cultivaron en medio BG11 (con nitrato), BG11 + 5 mM prolina, BG11₀ (sin nitrógeno combinado), o BG11₀ + 5 mM prolina, sin antibióticos, durante 15 días. Los cultivos se inocularon a razón de 0,5 $\mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.2. Catabolismo de la arginina y la ornitina

Resultados previos de este laboratorio (no publicados) habían sugerido que la arginina se podría catabolizar en *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante la enzima arginasa rindiendo ornitina, la cual se metabolizaría dando glutamato en lo que constituiría la típica ruta de la arginasa. Sin embargo, entre los productos del catabolismo de la arginina también se detectaban citrulina y prolina, cuya vía de generación en la ruta catabólica era desconocida. Para profundizar en el conocimiento del catabolismo de la arginina en *Synechocystis* sp. se llevaron a cabo los estudios que se presentan en este apartado.

3.2.2.1. Ensayos de catabolismo de la arginina y la ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para el estudio del destino metabólico de la arginina en esta cianobacteria se establecieron unas condiciones de ensayo estándar en la estirpe silvestre, las cuales se resumen a continuación junto con los resultados que se obtuvieron. Se realizaban ensayos *in vivo* en los que las células, que habían sido cultivadas en BG11, se suplementaban con concentraciones micromolares de arginina marcada radiactivamente con ^{14}C . La distribución de radiactividad entre los metabolitos presentes en la fracción soluble de las células se analizaba mediante TLC y autorradiografía, como se describe en materiales y métodos. La radiactividad contenida en principio en la [^{14}C]arginina suministrada como sustrato se recobraba, después de 15 minutos de ensayo, en siete manchas que se observaban tras el desarrollo de las cromatografías. Estas manchas se identificaron, mediante co-cromatografía con aminoácidos estables, como arginina, citrulina, prolina, glutamato, glutamina, ornitina y argininosuccinato (Figura 20).

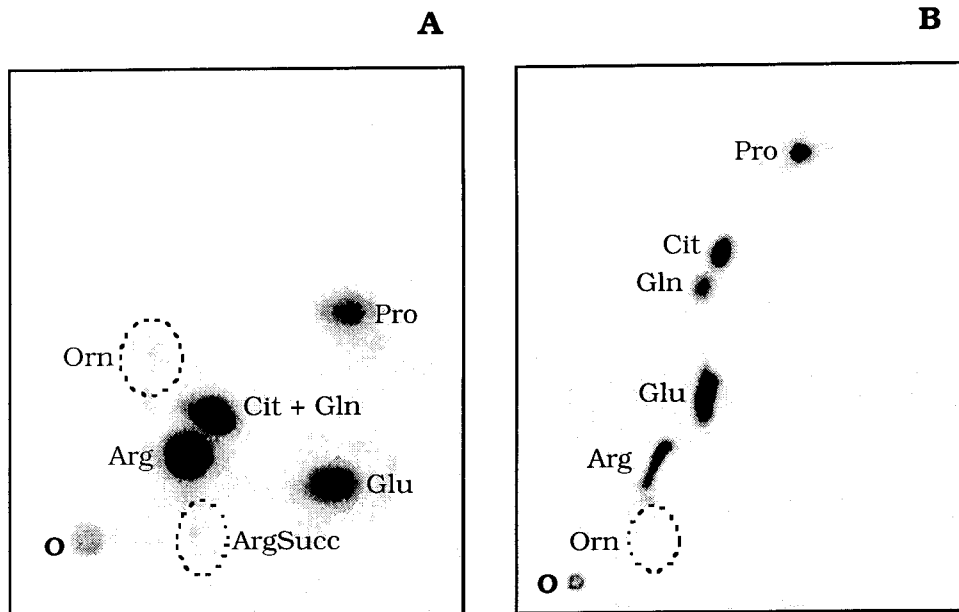


Figura 20. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la $[^{14}\text{C}]$ arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en BG11 se incubaron a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante 15 min en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,1 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]$ arginina. Tras la separación de las células del medio por filtración, los metabolitos celulares producidos se extrajeron y analizaron por TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos. Las figuras mostradas corresponden a una TLC desarrollada con el sistema de solventes I (A) y otra con el sistema de solventes II (B). Los aminoácidos identificados son: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina (Cit), glutamina (Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). El argininosuccinato no se resolvió con el sistema de solventes II. Nótese que la citrulina y la glutamina no se separaban con el sistema de solventes I. **O** señala el origen de la cromatografía.

La cuantificación de la radiactividad presente en las manchas obtenidas indicaba que, aparte de la propia arginina, los metabolitos en los que más radiactividad se acumulaba eran la citrulina, la prolina y el glutamato, y sólo una pequeña proporción quedaba como ornitina. Para corroborar que la producción de ornitina precedía a la de citrulina, prolina o glutamato en la degradación de la arginina, se realizaron ensayos a tiempos cortos, de 15 segundos de incubación, en presencia de $1,9 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]$ arginina. Los resultados indicaron que la ornitina era, en efecto, el primer aminoácido producido (Figura 21).

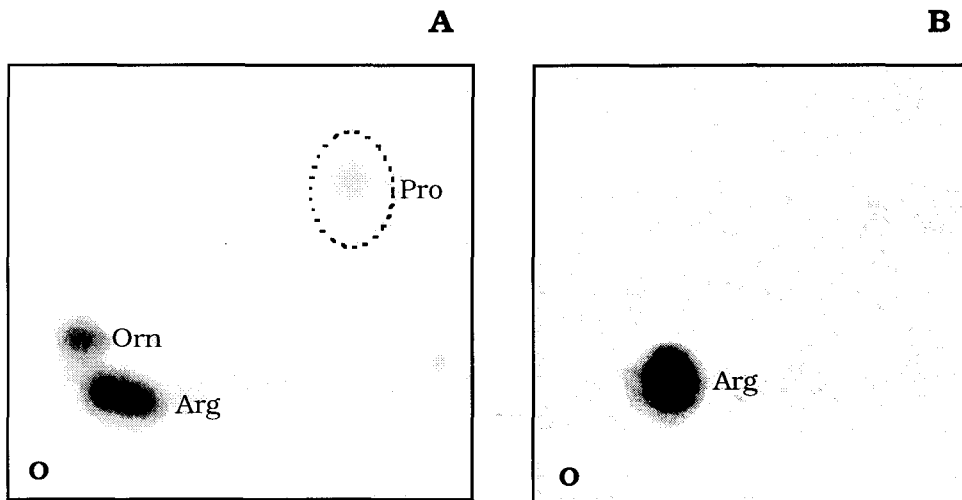


Figura 21. Metabolismo a tiempo corto de la $[^{14}\text{C}]$ arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

A. Células cultivadas en medio BG11 se incubaron a razón de $5,5 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,9 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]$ arginina. Tras 15 s de incubación, una muestra de 1 ml se mezcló con 2 ml de agua hirviendo, y los metabolitos que aparecieron marcados se analizaron como se describe en materiales y métodos. **B.** Muestra llevada en paralelo de células incubadas a 100°C durante 5 minutos antes del ensayo. Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn) y prolina (Pro). La mancha de arginina corresponde a la arginina intracelular más la extracelular, dado que en este experimento no se separaron las células por filtración antes de extraer los metabolitos. **O** señala el origen de la cromatografía.

También se suplementaron células de *Synechocystis* sp. con concentraciones micromolares de $[^{14}\text{C}]$ ornitina, un aminoácido que ha de incorporarse mediante el sistema de transporte de aminoácidos básicos y glutamina (Flores y Muro-Pastor, 1990), con el fin de estudiar los metabolitos que aparecían marcados a partir del mismo. Después de 15 minutos de ensayo y análisis mediante TLC y autorradiografía, la radiactividad se encontraba en los siguientes metabolitos: ornitina, arginina, citrulina, glutamina, prolina y glutamato (Figura 22). Los productos del catabolismo de la ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 son, por lo tanto, similares a los del catabolismo de la arginina.

Tanto en los ensayos de metabolismo de arginina como en los de ornitina, en los que éstos se suministraban a concentración $1\text{-}2 \mu\text{M}$, el aminoácido sustrato se agotaba del medio en el curso del ensayo.

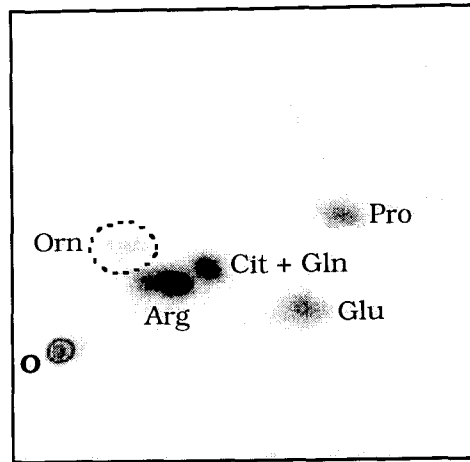


Figura 22. Metabolitos marcados con ^{14}C a partir de la [^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11 se incubaron a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ durante 15 min en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,1 \mu\text{M}$ de [^{14}C]ornitina. Tras la separación de las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron por TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos. La figura mostrada corresponde a una TLC desarrollada con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados son: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro) y glutamato (Glu). **O** señala el origen de la cromatografía.

3.2.2.2. Mutantes de las ORFs *sll0228* y *sll1077*

Consistentemente con los datos presentados en el apartado anterior, se encontró que *Synechocystis* sp. PCC 6803 exhibe una actividad arginasa (determinada en células permeabilizadas como se describe en el apartado 2.5.2 de materiales y métodos) de entre 20 y 50 nmol de ornitina producida $\cdot\text{mg}^{-1} \text{Chl}\cdot\text{min}^{-1}$.

Se buscaron entonces ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que determinaran proteínas que presentaran homología con arginasas de otros organismos, encontrándose dos ORFs, *sll0228* y *sll1077*, que mostraban homología con arginasas y otras enzimas relacionadas con arginasas.

Se generaron mutantes insercionales de cada una de estas dos ORFs siguiendo la estrategia general empleada para la obtención de mutantes de *Synechocystis* sp. en este trabajo. Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones, detallados en materiales y métodos, se denominaron Arg 1 y Arg 2 para la ORF *sll0228* y Arg 3 y Arg 4 para la *sll1077*.

En el caso de la ORF *sll1077*, la banda resultante de la PCR se clonó en el vector pGEM-T y la casete C.K3 se insertó en el sitio único *KpnI* del inserto del plásmido generado. Por otro lado, para la mutación de la ORF *sll0228*, la banda amplificada por PCR y clonada en primer lugar en pGEM-T fue transferida al vector pBluescript SK (+) antes de llevar a cabo la inserción de la casete. La enzima de restricción utilizada en

este caso, para la inserción de la casete C.C1, fue *Nco*I, para la cual el plásmido posee dos sitios de restricción en su inserto, por lo que la inserción de la casete fue acompañada de una delección de 155 pb.

Tabla 20. Plásmidos contruidos para la inactivación insercional de las ORFs *sll0228* y *sll1077* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSMJ9	Fragmento de 882 pb de la ORF <i>sll0228</i> , amplificado con los cebadores Arg 1 y Arg 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ10	Fragmento de 1175 pb de la ORF <i>sll1077</i> , amplificado con los cebadores Arg 3 y Arg 4, clonado en pGEM-T.
pCSMJ12	Fragmento <i>Sac</i> II- <i>Hin</i> II de pCSMJ9, conteniendo el fragmento amplificado de la ORF <i>sll0228</i> , clonado en pBluescript SK(+).
pCSMJ17	Plásmido que contiene la ORF <i>sll1077</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Kpn</i> I de pCSMJ10.
pCSMJ18	Plásmido que contiene la ORF <i>sll0228</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 entre los sitios <i>Nco</i> I de pCSMJ12.

La estirpe PCC 6803 se transformó con pCSMJ17 o pCSMJ18, seleccionándose la resistencia a Km y Cm, respectivamente, y las colonias resultantes de dicha transformación se cultivaron en las condiciones adecuadas para facilitar la segregación de las mutaciones (Km hasta $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la C.K3 y Cm hasta $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la C.C1). Se comprobó por PCR y por hibridación que los clones mutantes obtenidos eran homocigotos para los genes mutantes correspondientes (Figuras 23-I y 23-II).

Al mutante obtenido por inserción de la casete C.K3 en la ORF *sll1077* se le denominó CSMJ4 y al mutante con la ORF *sll0228* interrumpida por la C.C1, CSMJ3.

También se generó un mutante doble, con ambas ORFs interrumpidas, usando como parental la estirpe CSMJ4 que se transformó con el plásmido que contenía la ORF *sll0228* con la casete C.C1. Un clon de esta estirpe que se comprobó que había segregado la nueva mutación (Figuras 23-I y 23-II), se seleccionó para posteriores estudios y se denominó CSMJ5.

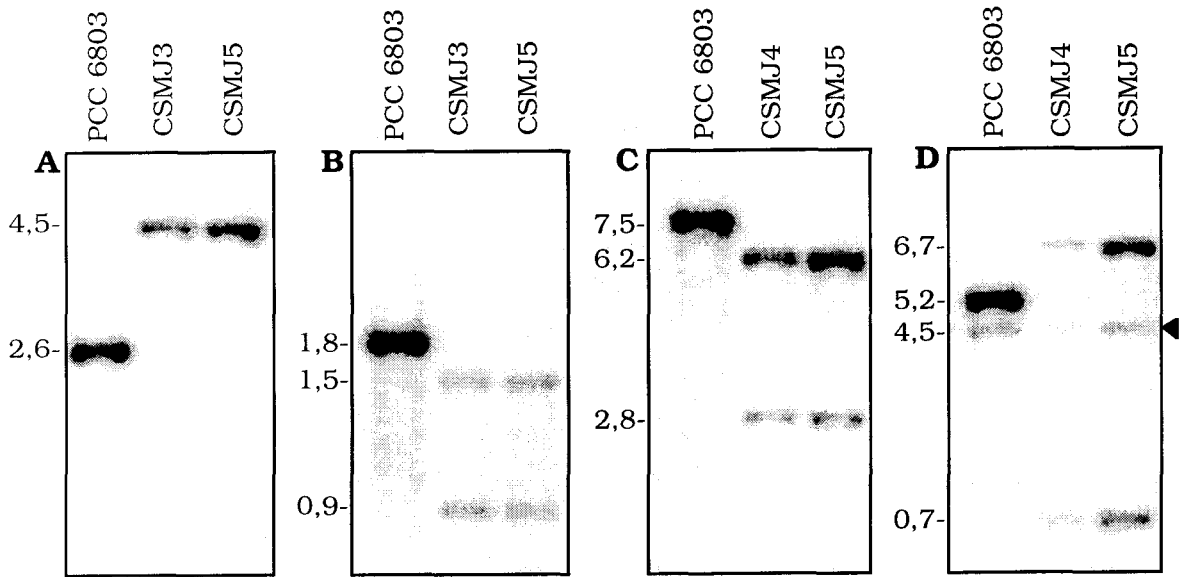


Figura 23-I. Estudio mediante análisis de Southern de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.

DNA total de las estirpes indicadas se digirió con las enzimas de restricción *DraI* (A), *RsaI* (B), *NcoI* (C) o *SmaI* (D). Se realizaron hibridaciones en condiciones restrictivas utilizando como sonda un fragmento que contenía parte de la ORF *sll0228* (A y B) o de la ORF *sll1077* (C y D). A la izquierda de la figura se indica el tamaño en kb correspondiente a las bandas obtenidas estimado usando como marcador el DNA del fago λ digerido con *ClaI*. La banda en D indicada con un triángulo se debe a una restricción parcial de un sitio *SmaI*.

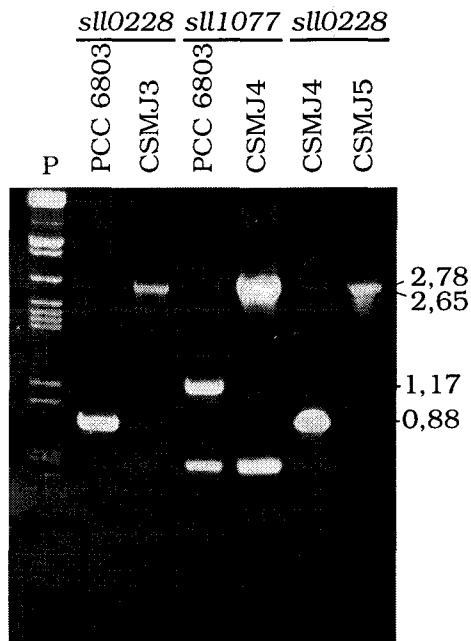


Figura 23-II. Análisis mediante PCR de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.

El DNA genómico de las estirpes PCC 6803, CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5 se analizó mediante amplificación por PCR. A la izquierda de cada estirpe mutante se presenta la estirpe parental correspondiente. Para el análisis de la *sll0228* se amplificó con los oligonucleótidos Arg 1 y Arg 2 y para el de la *sll1077* con Arg 3 y Arg 4. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas, estimado en base a dichos marcadores.

Si realmente alguna de estas dos ORFs determinara una arginasa en *Synechocystis* sp., se esperaría que el mutante correspondiente estuviera afectado en el crecimiento con arginina como fuente de nitrógeno, dado que como se ha mostrado antes, la arginasa parece representar la principal vía de degradación de la arginina en esta cianobacteria. Se realizaron curvas de crecimiento de la estirpe *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de los mutantes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5 en medio BG11 y BG11₀ + 5 mM de arginina. Las tasas de crecimiento de las cuatro estirpes eran muy similares tanto en BG11 como en BG11₀ con arginina, salvo en el caso del mutante CSMJ5 cuya tasa en BG11₀ + arginina era 1,6 veces inferior a la de la estirpe silvestre (Figura 24).

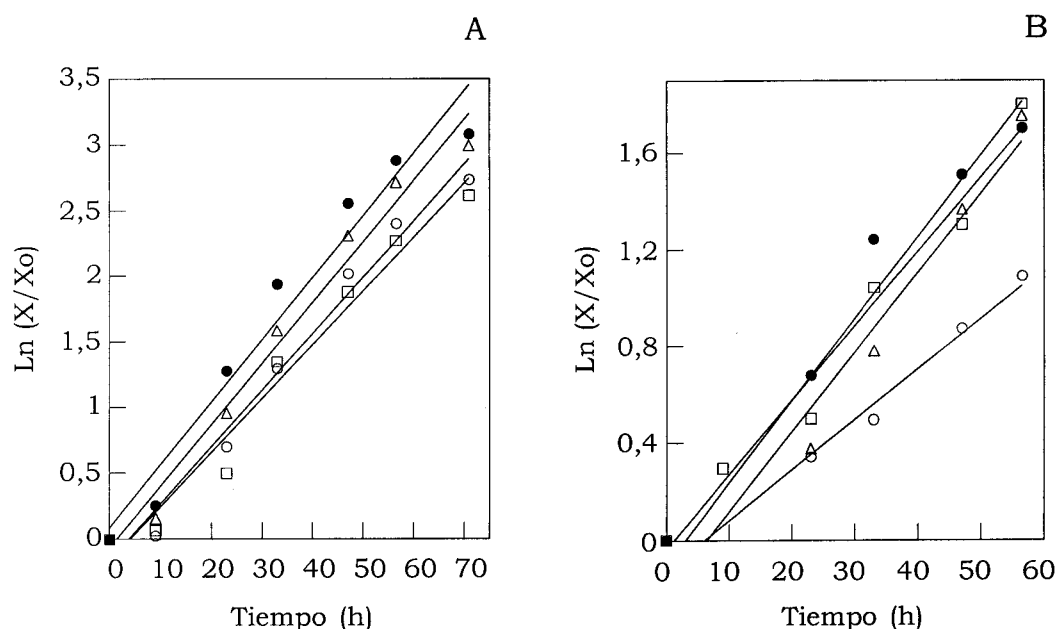


Figura 24. Crecimiento con nitrato o arginina como fuente de nitrógeno de los mutantes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.

Células de las estirpes PCC 6803 (●), CSMJ3 (□), CSMJ4 (▲) y CSMJ5 (○) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el antibiótico correspondiente en el caso de los mutantes) se lavaron y se resuspendieron en medio BG11 (A) o BG11₀ + 5 mM arginina (B) sin antibióticos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína del cultivo. X, μg de proteína·ml⁻¹ a diferentes tiempos de cultivo; X₀, μg de proteína·ml⁻¹ a tiempo cero.

Se realizaron ensayos de actividad arginasa en extractos crudos (apartado 2.5.3.2, materiales y métodos), de células de la estirpe silvestre y de los mutantes

CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5, detectándose una actividad arginasa similar en todos los casos (Tabla 21).

Tabla 21. Actividades arginasa y agmatinasa de las estirpes *Synechocystis* sp. PCC 6803, CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5.

Células de la estirpe silvestre PCC 6803 y de las estirpes mutantes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5 se cultivaron en medio BG110 con 5 mM de arginina. Estos cultivos se utilizaron para la obtención de extractos libres de células que se emplearon en ensayos de actividad arginasa y agmatinasa, determinadas como se describe en materiales y métodos. Los datos mostrados son la media de 2 ensayos independientes en el caso de la actividad arginasa y 4 en el caso de la actividad agmatinasa.

Estirpe	Actividad (nmol·mg ⁻¹ proteína·min ⁻¹)	
	Arginasa	Agmatinasa
PCC6803	0,442	0,281
CSMJ3	0,432	0,002
CSMJ4	0,451	0,195
CSMJ5	0,414	0,000

Se determinó entonces la actividad agmatinasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en los mutantes y se encontró que CSMJ3 carecía totalmente de dicha actividad, mientras que CSMJ4 mostraba aproximadamente un 69% de la actividad presente en la estirpe silvestre (Tabla 21). Estos datos identificaron a la ORF *sl10228* como un gen *speB* de *Synechocystis* sp., al ser necesario para la expresión de la actividad agmatinasa.

Para corroborar que la ORF *sl10228* determina una agmatinasa se consideró llevar a cabo ensayos *in vivo* en los que se suministrara a las células [¹⁴C]agmatina, para después comparar los productos obtenidos en la estirpe silvestre y en las estirpes CSMJ3, CSMJ4 y CSMJ5. Para ello, se produjo *in vitro* agmatina marcada radiactivamente, a partir de 84,2 μM de [¹⁴C]arginina, con 0,16 unidades de arginina descarboxilasa tipo II de *Escherichia coli* (Sigma). Se llevó a cabo la reacción durante 30 min a 37°C, tras lo cual se comprobó mediante TLC y autorradiografía que la totalidad de la arginina sustrato se había transformado, obteniéndose como resultado agmatina marcada. Al suplementar las células con la agmatina marcada, se observó que la estirpe PCC 6803 no transportaba dicho sustrato, por lo que no se pudo investigar la formación de metabolitos *in vivo* en esta cianobacteria a partir de la agmatina.

Al catalizar la agmatinasa una reacción en la que también se libera urea, y por lo tanto eventualmente NH₄⁺ con el concurso de la enzima ureasa constitutiva en esta cianobacteria (Valladares *et al.*, 1995), se ensayó si la agmatina podía ser utilizada por *Synechocystis* sp. PCC 6803 como fuente de nitrógeno. Se inocularon células de esta

cianobacteria a razón de 0,2 $\mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en medio BG11 y BG11₀ suplementado con 5 mM de agmatina pero, consistentemente con los experimentos de transporte, no se observó crecimiento a expensas de la agmatina.

3.2.2.3. Generación y fenotipo de mutantes *argF*, *argD* y *proC*

Haciendo uso, de nuevo, de la secuencia del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se aislaron mutantes insercionales carentes de algunas actividades enzimáticas que, según el patrón de productos catabólicos obtenidos (apartado 3.2.2.1), podrían estar implicadas en el metabolismo de la arginina y/o la ornitina en esta cianobacteria.

Las ORFs seleccionadas, en base a sus homologías, para su análisis se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas ArgD, ArgF y ProC.

Las tres ORFs del genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) que se muestran en la Tabla, relacionadas con genes de catabolismo de arginina de otros organismos, se seleccionaron para su estudio en este trabajo. La longitud de los productos hipotéticos de estas ORFs se indica como número de aminoácidos (aa). La posición relativa del comienzo de las ORFs en el genomio de PCC 6803 se indica (en kb) según el sistema de referencia establecido por Kaneko *et al.* (1996).

ORF	Longitud (aa)	Homología	Identities (%)	Posición (kb)
<i>sll0902</i>	308	ArgF, ornitina transcarbamilasa, cadena f, de <i>Bacillus subtilis</i>	48,5	3227
<i>str0661</i>	267	ProC, Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa de <i>Escherichia coli</i>	44	3339
<i>str1022</i>	429	ArgD, N-acetilornitina aminotransferasa de <i>Anabaena</i> sp.	72,5	641

Para la amplificación de fragmentos de DNA de estas ORFs, se diseñaron cebadores de 20-23 bases de longitud (ver materiales y métodos) que apareaban con secuencias internas o adyacentes a estas ORFs. Como resultado de las amplificaciones se obtuvieron fragmentos de DNA de entre 900 y 1700 pb conteniendo la totalidad o parte de las ORFs *sll0902*, *str1022* y *str0661*. Se clonaron dichos fragmentos en el vector pGEM-T (Tabla 2, materiales y métodos), originándose de esta forma los plásmidos pCSMJ3, pCSMJ34 y pCSMJ47, respectivamente (Tabla 23). La identidad de los fragmentos clonados se verificó mediante análisis de restricción y, en el caso del plásmido pCSMJ3, también secuenciando parte del inserto. Se digirieron estos plásmidos con endonucleasas que presentaban dianas de restricción únicas en sus insertos, con el objeto de inactivar dichas ORFs por inserción en tales dianas de una casete de resistencia a un antibiótico. Así, en el plásmido pCSMJ3 se insertó la casete

de resistencia C.K2, originándose el plásmido pCSMJ4, y en los plásmidos pCSMJ34 y pCSMJ47 se insertó la casete C.K3, originándose los plásmidos pCSMJ38 y pCSMJ48b, respectivamente. En el caso del plásmido pCSMJ38, la casete C.K3 se insertó en ambas orientaciones, de manera que se obtuvieron los plásmidos pCSMJ38a y pCSMJ38b.

Tabla 23. Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs *sll0902*, *slr0661* y *slr1022* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSMJ3	Fragmento de 910 pb de la ORF <i>sll0902</i> , amplificado con los cebadores Otc 3 y Otc 4, clonado en pGEM-T.
pCSMJ4	Plásmido que contiene la ORF <i>sll0902</i> interrumpida por inserción de la casete C.K2 en el sitio <i>EcoRV</i> de pCSMJ3.
pCSMJ34	Fragmento de 1063 pb de la ORF <i>slr1022</i> , amplificado con los cebadores ArgD 1 y ArgD 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ36	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1022</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ34.
pCSMJ38a	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1022</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ34, en la misma orientación que la ORF.
pCSMJ38b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr1022</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>SmaI</i> de pCSMJ34, en orientación opuesta a la de la ORF.
pCSMJ47	Fragmento de 1660 pb de la ORF <i>slr0661</i> , amplificado con los cebadores ProC 1 y ProC 2, clonado en pGEM-T.
pCSMJ48b	Plásmido que contiene la ORF <i>slr0661</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>EcoRI</i> de pCSMJ47, en la misma orientación que la ORF.

Se transformó la estirpe silvestre PCC 6803 con los plásmidos que contenían las versiones mutadas de los genes objeto de estudio y se seleccionaron clones transformantes en medio BG11 sólido suplementado con Km. En el caso de las ORFs *sll0902* y *slr1022*, el medio se suplementó, además, con 1 mM de citrulina, y en el caso de la *slr0661* con 1 mM de prolina. Para facilitar la segregación de las mutaciones, los transformantes resistentes a Km se cultivaron en medio líquido suplementado con Km a concentraciones de hasta 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Se comprobó la estructura cromosómica de estos mutantes mediante PCR, utilizando como molde para las amplificaciones DNA genómico de cada mutante y como cebadores los oligonucleótidos utilizados en la clonación correspondiente (Figura 25). También se comprobó la estructura cromosómica mediante hibridación, para todos los mutantes excepto el generado en la ORF *slr1022*, usando como sonda los fragmentos amplificados correspondientes generados por PCR (resultados no mostrados). Se comprobó así que para todas las ORFs analizadas se habían obtenido clones en los que

todas las copias del cromosoma contenían la ORF correspondiente inactivada. Los mutantes generados de esta forma se denominaron, CSMJ1 (*sll0902::C.K2*), CSMJ16a (*str1022::C.K3*), CSMJ16b (*str1022::C.K3*) y CSMJ39b (*str0661::C.K3*).

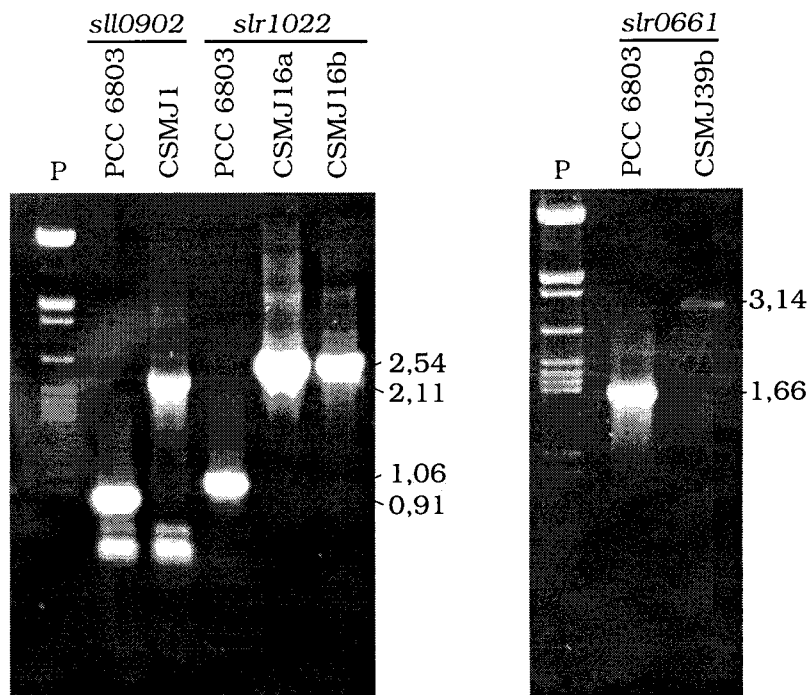


Figura 25. Estudio de la estructura de la región cromosómica mutada en las estirpes CSMJ1, CSMJ16a, CSMJ16b y CSMJ39b.

El DNA genómico de las estirpes CSMJ1, CSMJ16a, CSMJ16b, CSMJ39b y PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la región mutada usando como cebadores las parejas de oligonucleótidos empleadas para la clonación de cada una de las ORFs correspondientes (ver texto). A la izquierda de cada foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas estimado en base a dichos marcadores.

Si el mutante CSMJ1 estuviera realmente alterado en el gen *argF*, que determina la ornitina transcarbamilasa, enzima de la ruta biosintética de la arginina (Cunin *et al.*, 1986), debía requerir estrictamente citrulina (o arginina) para crecer. Se dispusieron gotas de suspensiones celulares de la estirpe CSMJ1, conteniendo aproximadamente 8×10^3 células, en cajas de medio BG11 suplementado con 1 mM de ornitina, citrulina o arginina o sin suplemento. Sólo se obtuvo crecimiento en aquellas cajas que contenían citrulina o arginina (Figura 26). También se realizaron curvas de crecimiento de CSMJ1 en medio BG11 y en medio BG11 suplementado con 1 mM de citrulina. En BG11 no se detectó crecimiento alguno, mientras que en BG11 + citrulina la constante específica de crecimiento (μ) de esta estirpe fue de $1,1 \text{ día}^{-1}$, mientras que la de la estirpe silvestre en estas mismas condiciones fue de 1 día^{-1} .

Del mismo modo, los mutantes CSMJ16a y CSMJ16b (inactivados en una ORF que determinaría una proteína homóloga a la *N*-acetilornitina aminotransferasa, ArgD), se comportaban como auxótrofos de arginina. Como se esperaba de un mutante *argD*, CSMJ16a y CSMJ16b crecían en medios que se habían suplementado con ornitina, citrulina o arginina, pero no en aquellos suplementados con glutamato o en BG11 sin ningún suplemento (Figura 26).

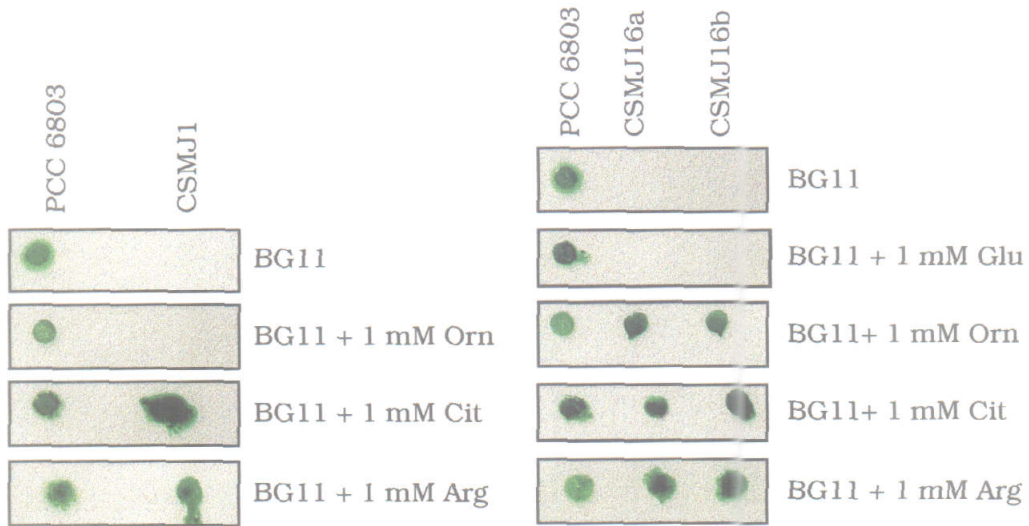


Figura 26. Ensayos de crecimiento de las estirpes *Synechocystis* sp. PCC 6803, CSMJ1, CSMJ16a y CSMJ16b.

Gotas de suspensiones celulares de *Synechocystis* sp. PCC 6803 o de los mutantes CSMJ1, CSMJ16a y CSMJ16b conteniendo, en medio BG11₀, aproximadamente 8×10^3 células se sembraron en cajas de medio BG11 y BG11 suplementado con los aminoácidos que se indican.

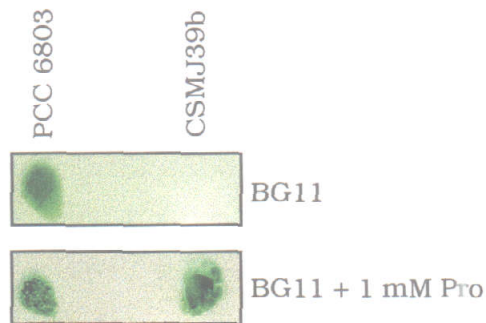


Figura 27. Ensayo de crecimiento de las estirpes *Synechocystis* sp. PCC 6803 y CSMJ39b.

Gotas de suspensiones celulares de *Synechocystis* sp. PCC 6803 o del mutante CSMJ39b conteniendo, en medio BG11₀, aproximadamente 8×10^3 células se sembraron en cajas de medio BG11 y BG11 suplementado con prolina 1 mM.

Por último, la ORF *slr0661* determinaría la Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa (el producto del gen *proC*), enzima biosintética de prolina. El mutante de esta ORF, CSMJ39b, como era de esperar, se comportaba como auxótrofo de prolina, ya que crecía

en cajas de medio BG11 suplementado con prolina y no en cajas de BG11 sin suplementar (Figura 27).

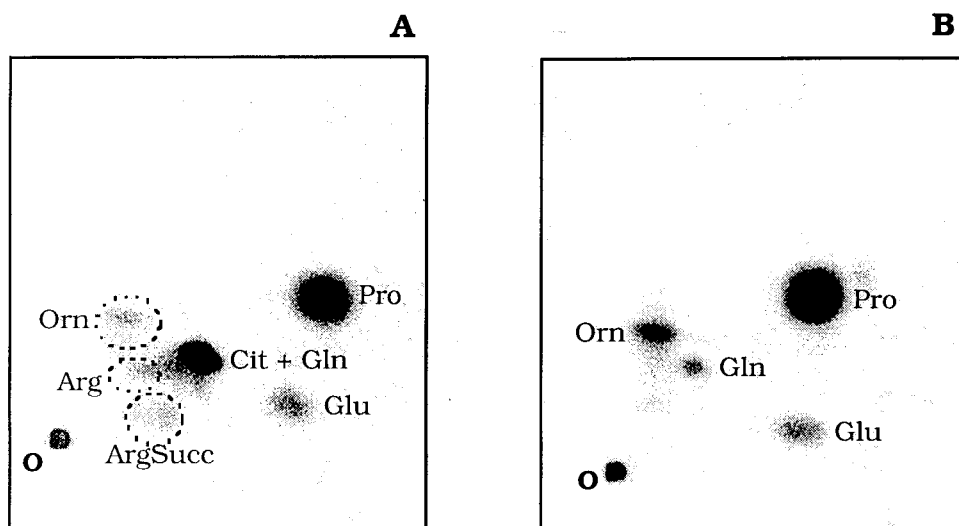
Se llevaron a cabo ensayos de actividad ornitina transcarbamilasa (ver apartado 2.5.1, materiales y métodos) con el fin de corroborar que la estirpe CSMJ1 era un mutante *argF*. Para ello, se partía de células que habían sido cultivadas en medio BG11 en el caso de la estirpe PCC 6803 y en medio BG11 suplementado con 1 mM de citrulina y 30 $\mu\text{g Km}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el caso del mutante CSMJ1. Para que las condiciones de ambas estirpes fueran lo más similares posible, se estudió también una muestra de la estirpe PCC 6803 que había sido cultivada en medio BG11 suplementado con 1 mM de citrulina. Los resultados mostraron que la actividad ornitina transcarbamilasa detectada en la estirpe silvestre, cultivada con o sin citrulina, era del mismo orden, 65-75 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, mientras que la estirpe mutante CSMJ1 carecía totalmente de esta actividad.

3.2.2.4. Catabolismo de la arginina y la ornitina en las estirpes CSMJ1, CSMJ15, CSMJ16a y CSMJ39b

Para analizar si las ORFs *sll0902* (ArgF, ornitina transcarbamilasa), *sll1561* (PutA, prolina oxidasa), *slr1022* (ArgD, N-acetilornitina aminotransferasa) y *slr0661* (ProC, Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa), estaban implicadas en el catabolismo de la arginina, se realizaron ensayos *in vivo* en los que los mutantes CSMJ1 (*argF*), CSMJ15 (*putA*), CSMJ16a (*argD*) y CSMJ39b (*proC*) se suplementaban con aminoácidos marcados radiactivamente y, tras 15 minutos de incubación, se analizaban sus productos metabólicos.

Cuando se suministró [^{14}C]ornitina a la estirpe CSMJ1, mutante carente de actividad ornitina transcarbamilasa, no se observó producción *in vivo* de [^{14}C]citrulina, mientras que los marcajes de las manchas de prolina, glutamato y glutamina eran mayores que los observados en la estirpe silvestre (Figura 28). Estas observaciones, junto con los datos de actividad ornitina transcarbamilasa mostrados anteriormente, confirmaban que la ORF *sll0902* era verdaderamente el gen *argF* de *Synechocystis* sp. y que este es el único gen que determina una ornitina transcarbamilasa en esta cianobacteria.

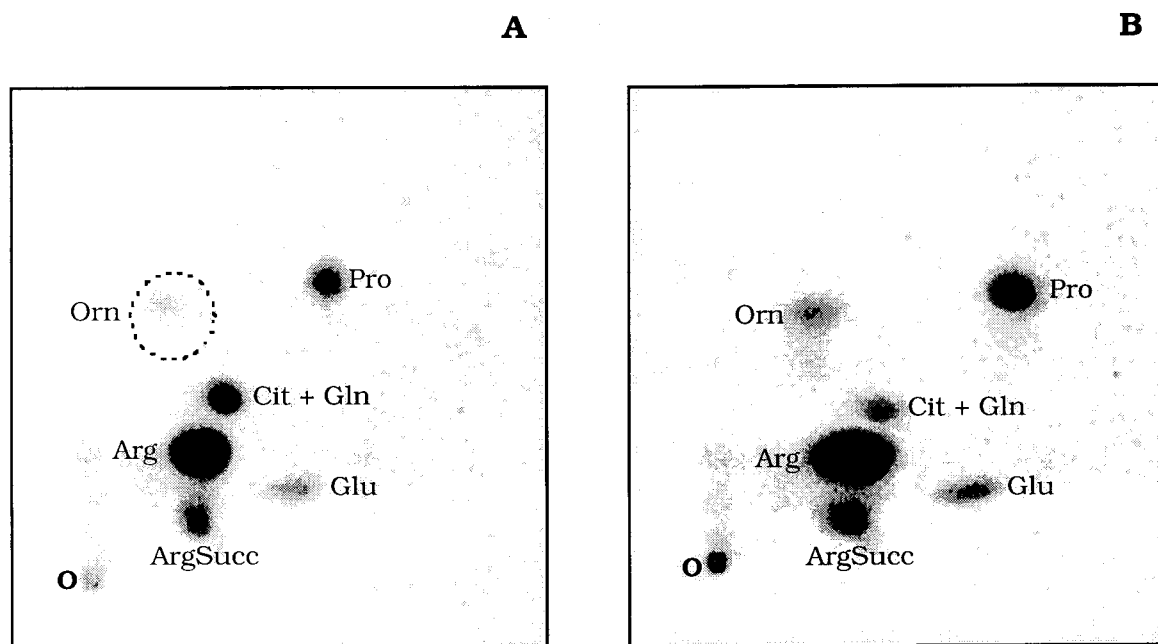
Para analizar el catabolismo de la [¹⁴C]arginina en la estirpe CSMJ1, se incubaron células de la misma y de la estirpe silvestre con 1-2 μM de [¹⁴C]arginina y se estudiaron los metabolitos que aparecían marcados tras 15 min de incubación. Los datos observados, en cuatro experimentos diferentes, revelaban que la cantidad de radiactividad acumulada como [¹⁴C]citrulina en la estirpe CSMJ1 se reducía a un 14-20% de los valores mostrados por la estirpe silvestre. Por el contrario, la cantidad de radiactividad acumulada como [¹⁴C]prolina, [¹⁴C]glutamato y [¹⁴C]glutamina en el mutante aumentaba hasta ser casi el doble de los valores de la estirpe silvestre (Figura 29).



Estirpe	Metabolitos marcados con ¹⁴ C (%):						
	Arg	Cit	Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	1,0	60,5	2,4	31,2	2,6	1,2	1,2
CSMJ1	0,0	0,0	5,1	85,8	5,7	3,5	0,0

Figura 28. Metabolitos marcados con ¹⁴C generados a partir de la [¹⁴C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ1.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ1 (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM citrulina, se incubaron durante 15 min, a razón de 9,2 μg Chl·ml⁻¹, en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con 1,1 μM de [¹⁴C]ornitina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en el apartado 2.4 de materiales y métodos. Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina (Cit), glutamina (Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). O señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, después de su resolución con los dos sistemas de solventes, siendo los valores mostrados las medias de los datos obtenidos en tres experimentos independientes.

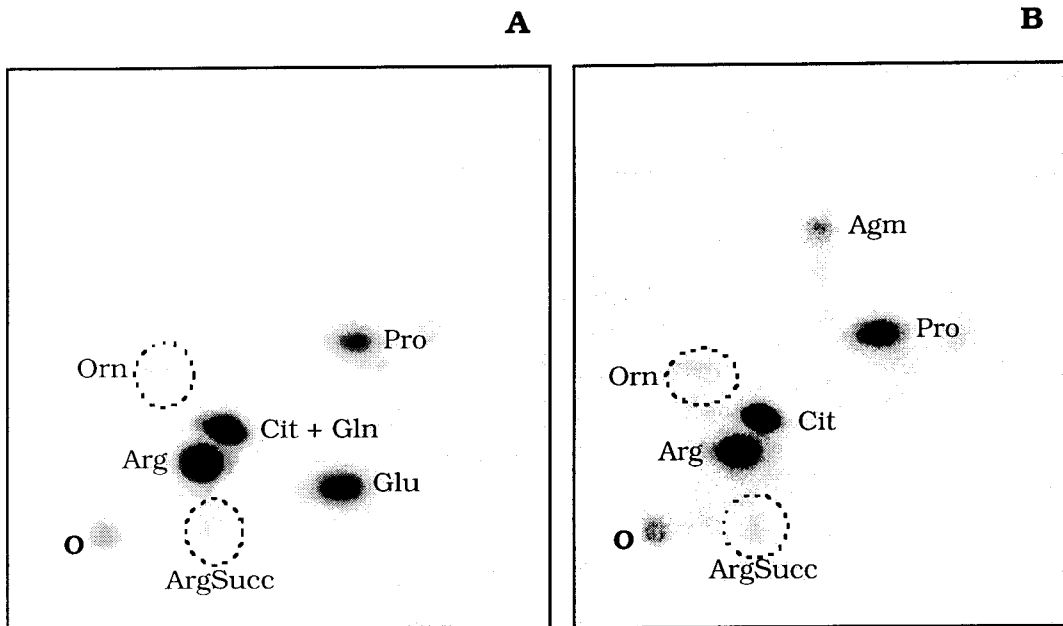


Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):						
	Arg	Cit	Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	36,5	36,3	0,1	17,6	5,7	2,6	1,3
CSMJ1	39,2	5,9	4,6	36,7	10,6	0,9	2,1

Figura 29. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la $[^{14}\text{C}]$ arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ1.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ1 (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM citrulina, se incubaron durante 15 min a razón de $5,8 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,9 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]$ arginina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). **O** señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con los sistemas de solventes I y II, siendo los valores mostrados las medias de los datos obtenidos en cuatro experimentos independientes.

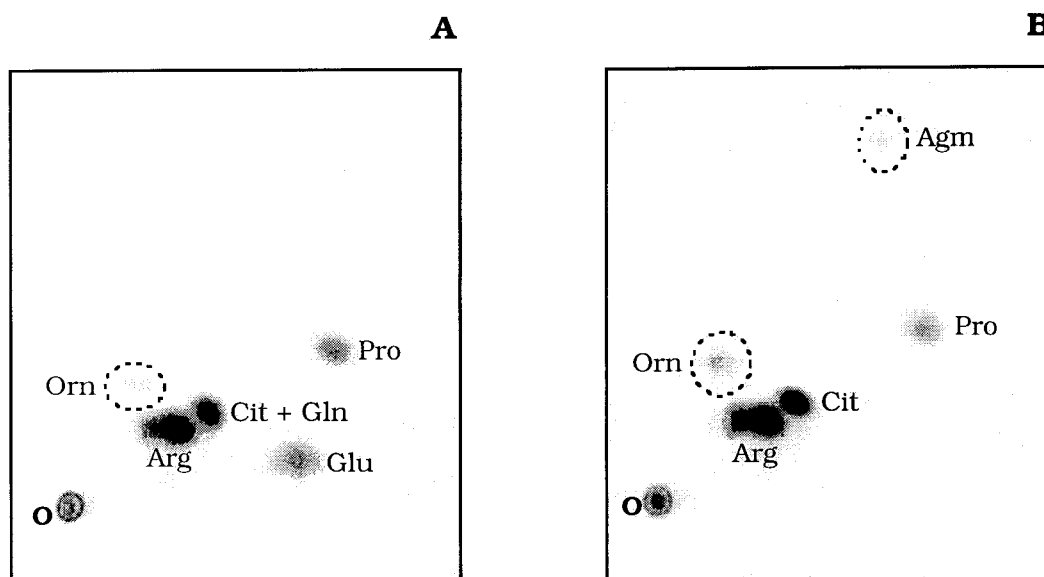
En los ensayos realizados con la estirpe CSMJ15, mutante de la prolina oxidasa, en los que se incubaba *in vivo* con 1-2 μM de [^{14}C]arginina (Figura 30) o con 1-1,5 μM de [^{14}C]ornitina (Figura 31), resaltaba la nula producción de [^{14}C]glutamato (y por lo tanto de [^{14}C]glutamina procedente de [^{14}C]glutamato). Cuando el sustrato era [^{14}C]arginina, esto iba acompañado de una acumulación de [^{14}C]prolina. Con este mutante se observó también la aparición de una pequeña cantidad de agmatina.



Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):							
	Arg	Cit	Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc	Agm
PCC6803	40,3	29,6	2,9	7,9	17,1	2,1	0,0	0,0
CSMJ15	28,4	40,0	0,0	24,5	0,0	3,3	0,7	3,1

Figura 30. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ15.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ15 (B), cultivadas en medio BG11, se incubaron durante 15 min a razón de 9,2 $\mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con 1,1 μM de [^{14}C]arginina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los metabolitos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina (Cit), glutamina (Gln) prolina (Pro), glutamato (Glu), argininosuccinato (ArgSucc) y agmatina (Agm). \bullet señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con los sistemas de solventes I y II, siendo los valores mostrados las medias de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

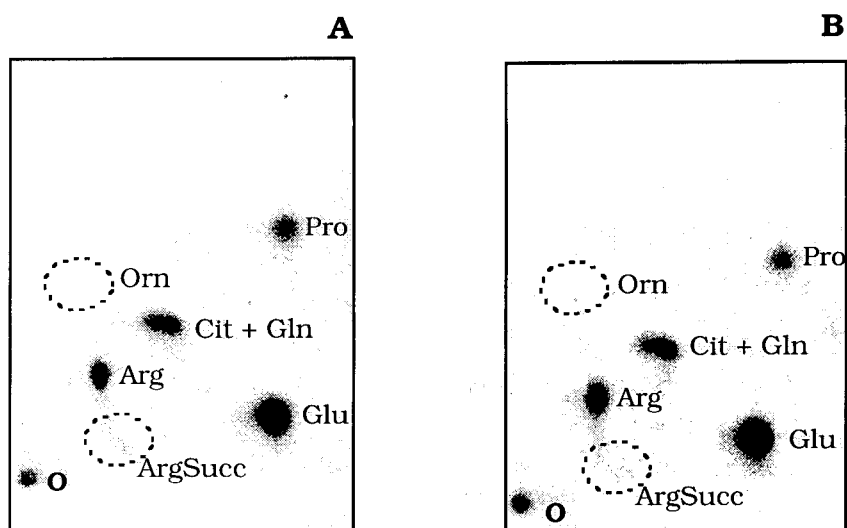


Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):						
	Arg	Cit+Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc	Agm
PCC6803	47,1	24,0	10,7	15,4	2,8	0,0	0,0
CSMJ15	56,9	29,8	7,0	0,0	4,4	0,7	1,2

Figura 31. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ15.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ15 (B), cultivadas en medio BG11, se incubaron durante 15 min a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,1 \mu\text{M}$ de [^{14}C]ornitina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los metabolitos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina (Cit), glutamina (Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y agmatina (Agm). \bullet señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito. Los valores mostrados son las medias de los datos obtenidos en dos experimentos independientes analizados sólo con el sistema de solventes I, por lo que la citrulina y la glutamina no se resolvieron en estos experimentos.

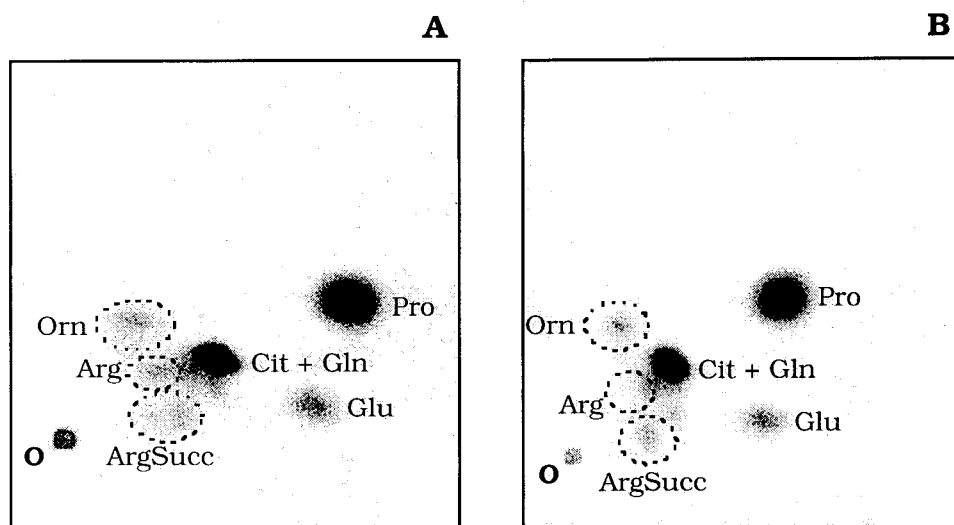
En el análisis de la estirpe CSMJ16a (mutante de la *N*-acetilornitina aminotransferasa), no se encontró ninguna o tan sólo una leve deficiencia en la producción de [¹⁴C]prolina y de [¹⁴C]glutamato, ya fuera a partir de [¹⁴C]arginina (Figura 32) o [¹⁴C]ornitina (Figura 33).



Estirpe	Metabolitos marcados con ¹⁴ C (%):					
	Arg	Cit+Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	15,5	14,5	9,3	59,7	0,3	0,7
CSMJ16a	19,7	12,6	4,7	62,4	0,2	0,5

Figura 32. Metabolitos marcados con ¹⁴C generados a partir de la [¹⁴C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ16a.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ16a (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM citrulina e incubadas sin citrulina durante 18 h, se incubaron durante 15 min a razón de 9,2 µg Chl·ml⁻¹ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con 1,1 µM de [¹⁴C]arginina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). ● señala el origen de la cromatografía. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes y en la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con el sistema de solventes I, en un experimento modelo.

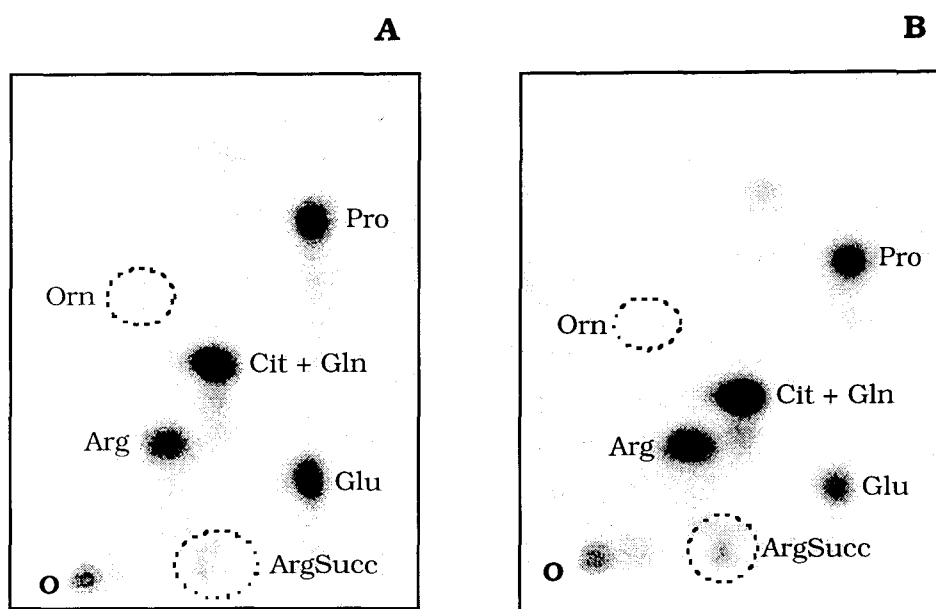


Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):					
	Arg	Cit+Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	1,1	52,7	40,2	3,2	1,6	1,2
CSMJ16a	1,6	52,0	40,4	3,3	1,5	1,2

Figura 33. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la $[^{14}\text{C}]$ ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ16a.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ16a (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM citrulina, se incubaron durante 15 min a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,1 \mu\text{M}$ de $[^{14}\text{C}]$ ornitina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los aminoácidos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). **O** señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con el sistema de solventes I, siendo los valores mostrados las medias de los datos obtenidos en dos experimentos independientes.

Por último, en los estudios encaminados a discernir si la estirpe CSMJ39b, mutante de la Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa (ProC), estaba afectada en el catabolismo de la arginina, se obtuvo como resultado que la suma de la acumulación de la radiactividad (a partir de [¹⁴C]arginina) en los aminoácidos glutamato y glutamina se encontraba reducida en el mutante, representando un 10% de la encontrada en la estirpe silvestre. El nivel de citrulina radiactiva generada, sin embargo, era unas 3,3 veces la encontrada en la estirpe silvestre. Por otro lado, aunque se encontraba disminuida, se observaba la formación de prolina en CSMJ39b (Figura 34).

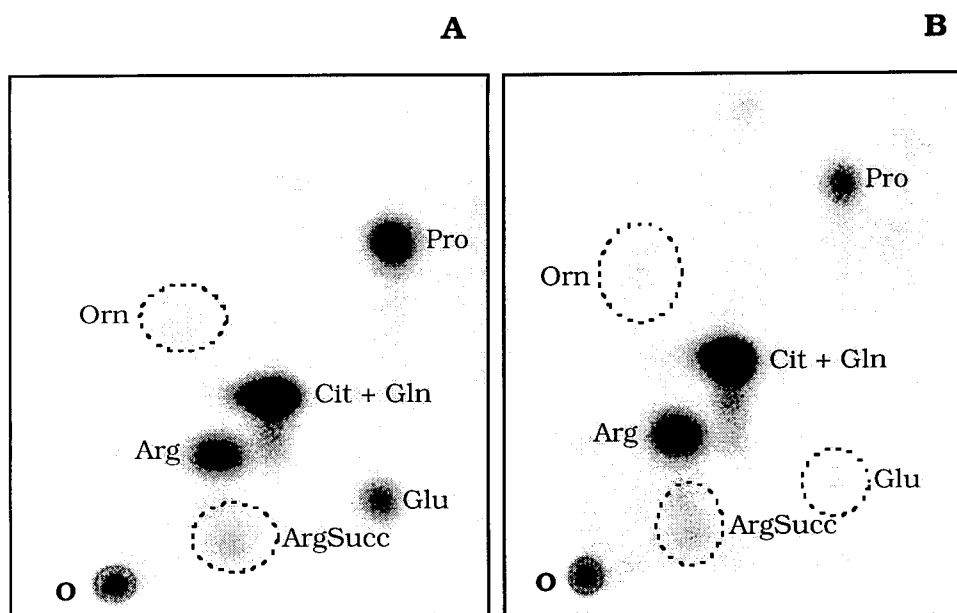


Estirpe	Metabolitos marcados con ¹⁴ C (%):						
	Arg	Cit	Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	14,1	19,9	5,5	11,8	47,7	0,3	0,7
CSMJ39b	21,7	66,2	1,4	5,8	3,7	0,2	1,0

Figura 34. Metabolitos marcados con ¹⁴C generados a partir de la [¹⁴C]arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ39b.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ39b (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM prolina, se incubaron durante 15 min a razón de 9,2 $\mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con 1,2 μM de [¹⁴C]arginina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los metabolitos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). **O** señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con los sistemas de solventes I y II, siendo los valores mostrados las medias de los datos obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Cuando el aminoácido que se suministraba era la [^{14}C]ornitina, la radiactividad presente en las manchas de glutamato y glutamina en la estirpe CSMJ39b se reducía hasta ser un 27% del valor encontrado en la estirpe silvestre. La prolina seguía encontrándose entre los metabolitos marcados como producto del catabolismo de la [^{14}C]ornitina en este mutante (Figura 35).



Estirpe	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):						
	Arg	Cit	Gln	Pro	Glu	Orn	ArgSucc
PCC6803	11,6	61,4	2,3	17,5	4,7	0,7	1,7
CSMJ39b	18,5	73,0	1,5	4,1	0,4	0,1	2,4

Figura 35. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de la [^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en la estirpe mutante CSMJ39b.

Células de la estirpe silvestre (A) y del mutante CSMJ39b (B), cultivadas en medio BG11 + 1 mM prolina, se incubaron durante 15 min a razón de $9,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón Tricina-NaOH (pH 8,1) suplementado con $1,3 \mu\text{M}$ de [^{14}C]ornitina. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos celulares se extrajeron y analizaron mediante TLC y autorradiografía como se describe en materiales y métodos (apartado 2.4). Las figuras mostradas corresponden a TLCs desarrolladas con el sistema de solventes I. Los metabolitos identificados fueron: arginina (Arg), ornitina (Orn), citrulina + glutamina (Cit + Gln), prolina (Pro), glutamato (Glu) y argininosuccinato (ArgSucc). \bullet señala el origen de la cromatografía. En la tabla se resume la cuantificación de la radiactividad contenida en cada metabolito, tras su resolución con los sistemas de solventes I y II, siendo los valores mostrados los datos obtenidos en un único experimento.

Nótese que la producción de [^{14}C]prolina a partir de [^{14}C]arginina y [^{14}C]ornitina en la estirpe CSMJ39b era inesperada, ya que ésta se comporta como un auxótrofo de prolina (este aspecto se discutirá en el apartado 4.3).

3.2.2.5. Mutantes dobles de la ruta de catabolismo de la arginina

Se generaron estirpes mutantes afectadas simultáneamente en dos de los genes descritos en los apartados anteriores. Se utilizó como estirpe parental el mutante CSMJ1 (*argF*) que se transformó con los plásmidos pCSMJ35 o pCSMJ36. El plásmido pCSMJ35, como se indicó en el apartado 3.2.1.1, contenía el gen *putA* inactivado por inserción de la casete C.C1. Por su parte, el plásmido pCSMJ36 (Tabla 23) contenía el gen *argD* inactivado por inserción también de la casete C.C1. Se seleccionaron clones de ambas transformaciones en medio BG11 suplementado con 1 mM de citrulina, 30 $\mu\text{g km}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g Cm}\cdot\text{ml}^{-1}$. A partir de estos clones, cultivándolos con Cm a concentraciones de entre 10 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, se obtuvieron de nuevo colonias aisladas.

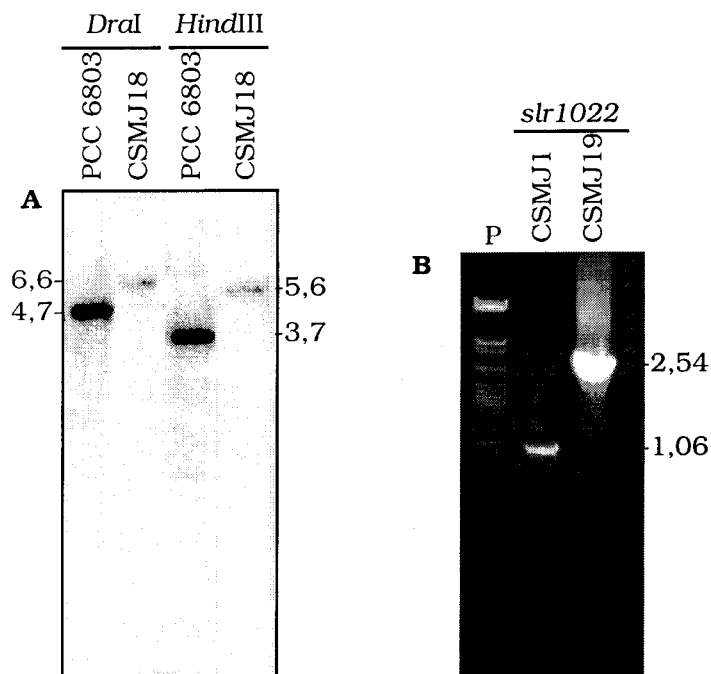


Figura 36. Estudio de la estructura de la región cromosómica que contiene la segunda mutación en las estirpes CSMJ18 y CSMJ19.

A- DNA total de las estirpes PCC 6803 y CSMJ18 se digirió con las enzimas de restricción *DraI* o *HindIII*. Se realizaron hibridaciones en condiciones restrictivas utilizando como sonda un fragmento de la ORF *sll1561* obtenido mediante PCR empleando como molde el plásmido pCSMJ33 y como cebadores los oligonucleótidos PutA 1 y PutA 2. Usando como marcador el DNA del fago λ digerido con *ClaI* se estimaron los tamaños correspondientes a las bandas; a ambos lados de la figura se indica el tamaño (en kb) de las mismas.

B- El DNA genómico de la estirpe mutante CSMJ19 y de la estirpe silvestre PCC 6803 se analizó mediante amplificación por PCR de la segunda región mutada usando como cebadores los oligonucleótidos ArgD 1 y ArgD 2. A la izquierda de la foto se muestran los marcadores de peso molecular correspondientes a la digestión de DNA del fago λ con la enzima *ClaI* (P). A la derecha se indica el tamaño (en kb) correspondiente a las bandas obtenidas estimado en base a dichos marcadores.

La estructura genómica de las estirpes generadas se comprobó mediante PCR en el caso de la mutación de *argD* y mediante hibridación en el caso de la mutación de *putA* (Figura 36). Las estirpes conteniendo la nueva mutación segregada se denominaron CSMJ18, el mutante con inserciones en *argF* y *putA*, y CSMJ19, el mutante con inserciones en *argFargD*.

Los mutantes CSMJ18 y CSMJ19 se sometieron a ensayos de catabolismo de [^{14}C]arginina y [^{14}C]ornitina y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24. Catabolismo de la [^{14}C]arginina y la [^{14}C]ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y en las estirpes mutantes CSMJ18 y CSMJ19.

Células cultivadas en medio BG11 suplementado con 1 mM de citrulina (y los antibióticos adecuados en el caso de los mutantes), se utilizaron en ensayos de 15 min en presencia de 1 μM de [^{14}C]arginina o [^{14}C]ornitina, según se indica en cada experimento. Tras separar las células del medio por filtración, los metabolitos se extrajeron y se analizaron mediante TLC con el sistema de solventes I. Los datos se presentan como el porcentaje de la suma total de radiactividad en metabolitos solubles y son el resultado de una única determinación.

Experi- mento	Estirpe	Genotipo	Sustrato	Metabolitos marcados con ^{14}C (%):					
				Arg	Cit + Gln	Pro	Glu	Orn	Argsucc
1	PCC6803		[^{14}C]Arg	61,3	15,4	12,7	2,0	1,0	7,6
	CSMJ18	<i>argFputA</i>	[^{14}C]Arg	68,9	3,6	22,1	0,0	3,9	1,5
	CSMJ19	<i>argFargD</i>	[^{14}C]Arg	59,6	3,1	20,1	8,8	2,0	6,5
2	PCC6803		[^{14}C]Orn	1,1	52,7	40,2	3,2	1,6	1,2
	CSMJ18	<i>argFputA</i>	[^{14}C]Orn	0,0	0,0	87,2	0,0	12,7	0,0
	CSMJ19	<i>argFargD</i>	[^{14}C]Orn	0,0	3,1	77,2	12,5	7,2	0,0

En los ensayos realizados con [^{14}C]arginina, destaca la severa disminución de radiactividad encontrada en citrulina (determinada aquí junto con la glutamina), acompañada de un aumento en prolina. Este es un resultado característico de la mutación *argF* (ornitina transcarbamilasa). El mutante CSMJ18, al estar además afectado en *putA*, no mostraba ninguna formación de glutamato, mientras que la producción de glutamato aumentaba en CSMJ19.

Por otro lado, cuando se suplementaba con [^{14}C]ornitina, en el caso de CSMJ18 la radiactividad se concentraba en las manchas de ornitina y prolina, mientras que en CSMJ19 también se observaba formación de glutamato y de glutamina (determinada aquí junto con la citrulina).

3.2.2.6. Crecimiento con arginina como fuente de nitrógeno

Como ya se ha mencionado, *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede utilizar la arginina como fuente de nitrógeno. Se llevaron a cabo una serie de estudios para evaluar la capacidad de crecimiento a expensas de arginina de algunos mutantes afectados en elementos de la ruta del catabolismo de la arginina.

Tabla 25. Crecimiento con arginina como fuente de nitrógeno de la estirpe PCC 6803 y de algunas estirpes mutantes.

Células de las estirpes indicadas cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos y aminoácidos en los casos necesarios) se lavaron y se resuspendieron en medio BG110 + 5 mM arginina sin suplementos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína del cultivo. Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes con resultados muy similares.

Estirpe	Genotipo	Constante específica de crecimiento (μ) (día ⁻¹)
PCC6803		0,96
CSMJ1	<i>argF</i> ⁻	0,84
CSMJ15	<i>putA</i> ⁻	0,64
CSMJ18	<i>argF</i> ⁻ <i>putA</i> ⁻	0,71

Como se observa en la Tabla 25, la mutación del gen *putA* tenía un efecto negativo sobre el crecimiento superior al de la mutación del gen *argF*, no observándose una disminución mayor del crecimiento por la mutación de los dos genes.

4. DISCUSIÓN



4. DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE ORGANISMOS CON GENOMIO SECUENCIADO

Desde el año 1996 se dispone de la secuencia completa del cromosoma de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803. La disponibilidad de genomios secuenciados supone un avance radical en el estudio de los genes de los organismos correspondientes. Mediante comparación con las proteínas presentes en las bases de datos, se puede realizar un análisis exhaustivo de las distintas pautas abiertas de lectura (ORF) presentes en el cromosoma secuenciado. Con ello se consigue una aproximación al conocimiento de los procesos que es capaz de ejecutar el organismo en cuestión, deducido de las posibles funciones de los productos de dichas ORFs en los distintos procesos biosintéticos, catabólicos, reguladores, etc. que ocurren en las células. Aunque algunas veces, como ha discutido Saier (1998), la evolución independiente de distintos organismos en distintos hábitats puede hacer que la similitud a nivel de secuencia que mantienen proteínas homólogas que desempeñan la misma función sea muy baja, es común encontrar proteínas cuyas secuencias de aminoácidos muestran un grado de similitud significativo y que ejercen funciones similares o idénticas en los diferentes organismos. Para el desarrollo de este trabajo ha sido fundamental el tener acceso a la secuencia del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y poder analizar las distintas ORFs que podrían estar implicadas en los procesos objeto de nuestro interés: sistemas de membrana responsables del transporte de aminoácidos y vías catabólicas de los aminoácidos arginina y prolina.

4.2. TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

En este trabajo se han identificado genes que determinan algunos de los elementos de los sistemas de transporte de aminoácidos de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Se seleccionaron algunas ORFs del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) cuyos productos hipotéticos eran homólogos a proteínas de transporte de otros organismos (Tabla 3). Estas ORFs fueron inactivadas mediante inserción de una casete de resistencia a los antibióticos Km o Cm, consiguiéndose en todos los casos, excepto en uno, estirpes que portaban sólo cromosomas mutantes.

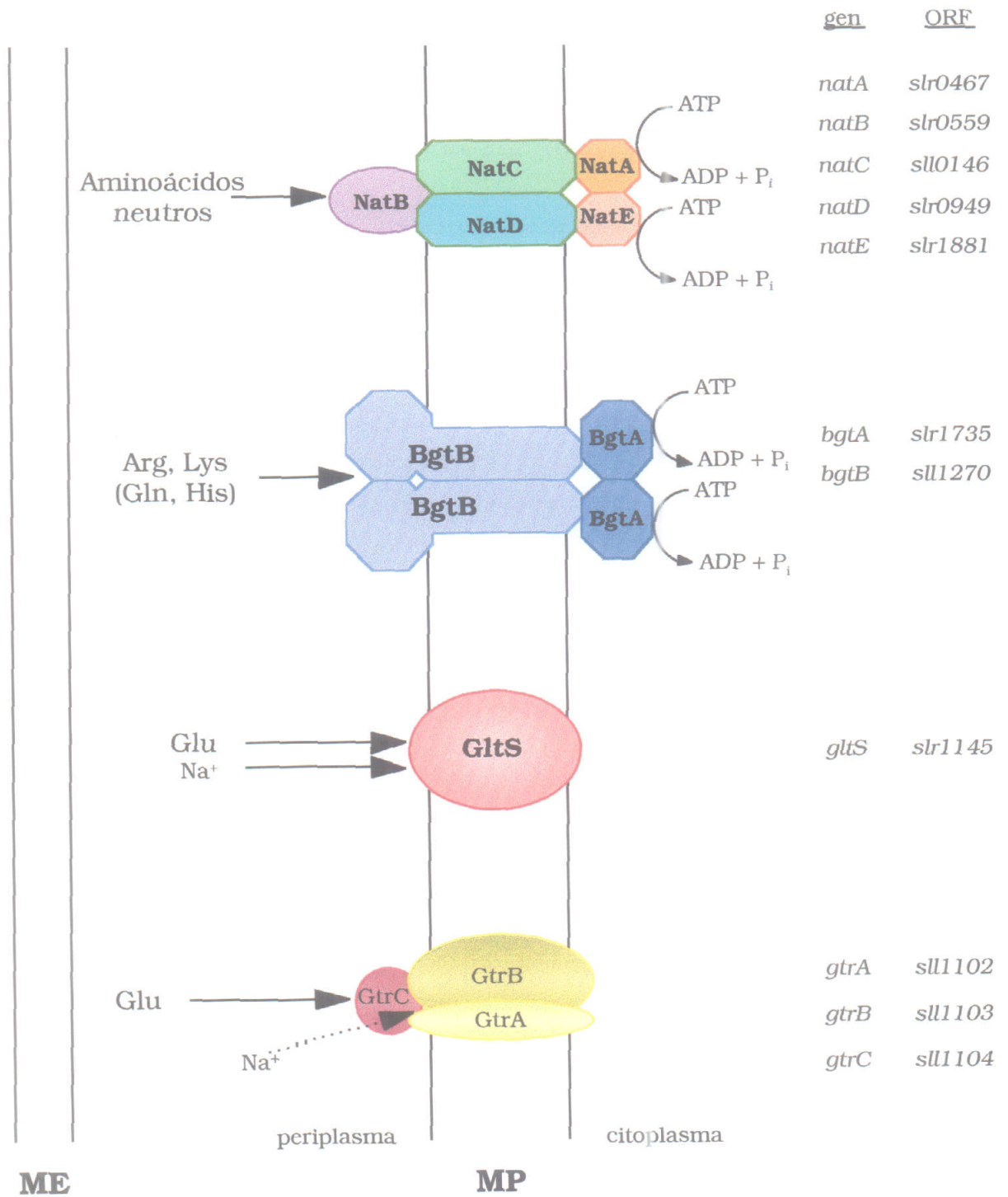


Figura 37. Representación esquemática de los transportadores de aminoácidos identificados en *Synechocystis* sp. PCC 6803. ME: membrana externa. MP: membrana plasmática.

El transportador Nat

Se determinó que las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146* (inactivadas en las estirpes CSMJ36b, CSMJ37b y CSMJ41a y CSMJ41b, respectivamente) son necesarias para el transporte de los aminoácidos neutros ensayados: alanina, glicina, prolina, serina y leucina (Tabla 5). Como se mencionó en la Introducción, se ha descrito que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 los aminoácidos neutros (excepto la glutamina) comparten un sistema de transporte (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1997). Deducimos, por tanto, que las ORFs *slr0949*, *slr1881* y *sll0146* determinan elementos del transportador de aminoácidos neutros de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y las denominamos *natD*, *natE* y *natC*, respectivamente.

El gen *natD* determinaría una proteína de 286 aminoácidos homóloga a BraD de *Pseudomonas aeruginosa*, el gen *natE* determinaría una proteína de 240 aminoácidos homóloga a BraG y el gen *natC* daría lugar a una proteína de 372 aminoácidos homóloga a BraE. BraD, BraG y BraE son proteínas que pertenecen al sistema de transporte LIV-I de *Pseudomonas aeruginosa* (Hoshino y Kose, 1990a). Este sistema transporta leucina, isoleucina, valina, alanina y treonina y es un sistema de tipo multicomponente determinado por el operón *braCDEFG* (Hoshino y Kose, 1990b). BraC es la proteína periplásmica de unión de sustrato (Hoshino y Kose, 1989), BraD y BraE son las proteínas integrales de membrana y BraF y BraG los componentes conservados del sistema (Hoshino y Kose, 1990a). De manera análoga a este sistema LIV-I, existiría un sistema Nat para el transporte de aminoácidos neutros en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Este sistema estaría constituido por cinco genes: *natA*, *natB*, *natC*, *natD* y *natE*. NatB sería la proteína periplásmica de unión de sustrato (Montesinos *et al.*, 1997), NatC y NatD las proteínas integrales de membrana y NatA (Montesinos *et al.*, 1997) y NatE los componentes conservados del sistema (Figura 37). Los genes *natA*, *natB*, *natC*, *natD* y *natE* de *Synechocystis* sp. no están agrupados, sino que, por el contrario, ocupan posiciones distantes en el cromosoma (posiciones 2601 kb, 2799 kb, 2192 kb, 2017 kb y 1239 kb, respectivamente), hecho que tampoco es de extrañar teniendo en cuenta que *Synechocystis* sp. tiene la proporción más baja de agrupamientos en operón entre los genomios hasta ahora secuenciados (Tomii y Kanehisa; 1998).

El transportador Bgt

Las ORFs *sll1270* y *slr1735* (inactivadas en las estirpes CSMJ7 y CSMJ8a y CSMJ8b, respectivamente) son necesarias para el transporte de los aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina y del aminoácido neutro glutamina (Tabla 6), por lo que las denominamos *bgtB* y *bgtA*, respectivamente.

El gen *bgtB* determinaría una proteína de 530 aminoácidos homóloga al componente transmembrana (GlnP), por un lado, y a la proteína periplásmica de unión de sustrato (GlnH), por otro, del sistema de transporte para la entrada de glutamina de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Se trataría, por tanto, de una proteína periplásmica de unión de sustrato fusionada a una proteína integral de la membrana. Esta organización de los componentes del sistema Bgt se asemejaría a la de los sistemas multicomponentes de las bacterias Gram-positivas que, al carecer de membrana externa, poseen lipoproteínas que se anclan a la membrana plasmática para asegurar la captura y retención del sustrato (Higgins *et al.*, 1990). Otra posibilidad sería que el transcrito originara dos proteínas independientes; sin embargo, analizando la secuencia de esta ORF no hay evidencias de que sea este el caso ya que dentro de la ORF *sll1270* no se detecta ningún posible sitio de unión del ribosoma. Sí se encuentra uno (secuencia 5' AGGAG 3') ocho nucleótidos por delante del codón de iniciación del gen *bgtB* (ATG). De hecho, al contrario de lo que ocurre en otras bacterias cuyos genomas han sido secuenciados, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han encontrado varias proteínas de unión de sustrato que estarían fusionadas a otros componentes de los transportadores tipo ABC, como es el caso de la *sll1452* y la *slr0043* en las que se da una fusión entre la proteína de unión de sustrato y el componente conservado del mismo sistema de transporte (Tomii y Kanehisa; 1998).

El gen *bgtA* determinaría una proteína de 252 aminoácidos con un alto grado de similitud con los componentes conservados de los sistemas de transporte tipo ABC responsables del transporte de aminoácidos tales como la histidina o la glutamina en diversas bacterias.

Ambos elementos (BgtA y BgtB) forman parte del sistema Bgt y, dada la arquitectura habitual de los transportadores ABC, probablemente existan dos subunidades de cada uno de estos componentes en cada transportador encontrándose por lo tanto en forma de homodímeros (Figura 37). Alternativamente, podría haber ORFs en el genoma de *Synechocystis* sp. que determinaran un segundo juego de componentes complementarios a BgtB y BgtA en el transportador Bgt, pero por el momento no hay pruebas de su existencia.

Los resultados obtenidos en este trabajo (véase, por ejemplo, la Tabla 7) permiten identificar al sistema Bgt como el responsable del transporte de arginina de alta afinidad que exhibe *Synechocystis* sp. PCC 6803, cuya K_S es del orden de μM (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Cuando, sin embargo, la concentración de arginina utilizada en los experimentos de transporte era $100 \mu\text{M}$, en los mutantes del sistema Bgt se observaba una actividad de transporte que no se manifestaba con $1 \mu\text{M}$. Los mutantes de este sistema eran además capaces de crecer en medios suplementados con arginina a concentración 5 mM como única fuente de nitrógeno, aunque este

crecimiento fuese más pobre que el de la estirpe silvestre en las mismas condiciones (Figura 7). Estos resultados sugieren la presencia de otro sistema de transporte, de menor afinidad que el Bgt, para la arginina en esta cianobacteria, sistema que permanece aún sin identificar.

Aunque previamente se hayan descrito dos componentes cinéticos para el transporte de lisina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Flores y Muro-Pastor, 1990), la lisina parece transportarse al interior celular de forma exclusiva por el sistema Bgt independientemente de la concentración de sustrato empleada en el ensayo (Tabla 7).

El sistema Bgt es responsable también de una fracción del transporte de histidina que exhibe *Synechocystis* sp. PCC 6803, siendo mediada por el sistema Nat la otra fracción del mismo (Tabla 10). También la sensibilidad a histidina que manifiestan los mutantes *bgt* (Figura 8) es consistente con la existencia de más de una vía de entrada de histidina en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los resultados que se recogen en las Tablas 7 y 10 sugieren que Nat transporta histidina con mayor afinidad que Bgt.

Los resultados obtenidos con los mutantes *bgt* (Tablas 6 y 7) permiten sugerir que Bgt es también un transportador de glutamina, aunque ésta haya de incorporarse a las células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 también mediante otro transportador. La sensibilidad a la azaserina (análogo de la glutamina) de los mutantes *bgt* (Figura 8) es también consistente con la existencia de más de una vía de entrada de glutamina en la célula. Estos resultados son consistentes con los descritos por Labarre *et al.* (1987) y Flores y Muro-Pastor (1990), que definieron la existencia de un sistema de transporte de aminoácidos básicos y glutamina en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Labarre *et al.* (1987) publicaron unos valores de K_S (glutamina) de 5 mM para el sistema de aminoácidos básicos/glutamina y de 0,01 mM para el otro sistema, que sugirieron que sería un transportador de glutamina/glutamato. Estudios de competencia en el transporte han indicado, sin embargo, que la sugerencia de la existencia en esta cianobacteria de un transportador de glutamina/glutamato no está justificada (Montesinos *et al.*, 1997). El análisis de los dobles mutantes Bgt Nat (Tablas 8 y 9) ha identificado inequívocamente al sistema Nat como el responsable de la actividad de transporte de glutamina remanente en los mutantes *bgt*. Así, el sistema Nat ha de considerarse un transportador de aminoácidos neutros sin la excepción de la glutamina, mostrando una alta afinidad para ésta (K_S , $\sim 2 \mu\text{M}$; Figura 10). Los resultados mostrados en las Tablas 7 y 9 indican que el transporte de glutamina de baja afinidad (mediado por Bgt) es de mayor capacidad que el de alta afinidad (mediado por Nat).

También se comprobó que los mutantes *bgt* eran resistentes al MSX (análogo de la metionina y del glutamato) que inhibía el crecimiento de la estirpe PCC 6803 (Figura 8). Esto podía indicar que la mutación en alguno de los elementos del sistema Bgt estaba afectando la entrada de este análogo. El fenotipo de transporte de estos

mutantes para el aminoácido neutro metionina no fue estudiado y en el caso del transporte de glutamato los resultados obtenidos (Tabla 6) no permiten asignar un papel fundamental al sistema Bgt, por lo que en este momento no podemos explicar la base de la resistencia al MSX de los mutantes Bgt.

Transporte de glutamato

A pesar de que la disminución de la actividad de transporte de glutamato en la estirpe CSMJ6a es parcial, se puede proponer que la ORF *slr1145* (inactivada en la estirpe CSMJ6a) está implicada en el transporte de glutamato dependiente de sodio en *Synechocystis* sp. PCC 6803, si bien su producto no sería la única proteína responsable de la entrada de este aminoácido en esta cianobacteria. A esta ORF la denominamos *gltS* por determinar una proteína homóloga al transportador GltS de *E. coli* con el que comparte un 45% de residuos de aminoácidos idénticos (Figura 11). Como se esperaría de una proteína de transporte, el perfil de hidrofobicidad que presenta la proteína GltS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 muestra la existencia de doce posibles dominios de expansión de membrana.

Se detectó otra posible vía de entrada de glutamato, también dependiente de sodio, cuando se estudió el fenotipo de los mutantes CSX67 y CSX68 afectados en las ORFs *sll1102/sll1103* y *sll1104*, respectivamente (Tabla 17). El transporte de glutamato se reducía en dichos mutantes hasta aproximadamente un 70% de la actividad mostrada por la estirpe PCC 6803. El efecto similar de estas mutaciones en el transporte puede sugerir que las ORFs *sll1102*, *sll1103* y *sll1104* determinen elementos pertenecientes a un mismo sistema. Consistentemente, la localización cromosómica (Figura 14) de estos genes es compatible con la posibilidad de que formen una unidad transcripcional. (Ha de tenerse en cuenta que la mutación en *sll1102/sll1103* no debe impedir la transcripción de *sll1104* al haberse usado para generarla una casete, C.K3, con un promotor fuerte y sin terminadores de la transcripción; Elhai y Wolk, 1988). Denominamos *gtrA* a la ORF *sll1102*, *gtrB* a la ORF *sll1103* y *gtrC* a la ORF *sll1104* (*gtr* deriva de "glutamate", el sustrato que hemos identificado, y "tripartite", por la homología de este sistema con el TRAP). Esta identificación es consistente con la homología de GtrC con proteínas periplásmicas de unión de glutamina/glutamato/asparragina/aspartato. Mientras que el sistema TRAP de *Rhodobacter capsulatus* se energiza mediante el gradiente de H⁺, la dependencia de Na⁺ del sistema Gtr podría sugerir que la energización de dicho sistema opera a través de un gradiente de Na⁺. Sin embargo, el sistema Gtr podría ser análogo a un transportador de glutamato de *Rhodobacter sphaeroides* que requiere Na⁺ y utiliza una proteína periplásmica pero parece energizarse por el gradiente electroquímico de protones (Jacobs *et al.*, 1996).

Desafortunadamente, los genes que determinan este sistema no se han identificado todavía.

Por lo tanto, hemos definido cuatro genes que determinan proteínas implicadas en el transporte de glutamato al interior celular en *Synechocystis* sp. PCC 6803, de las cuales GltS es responsable aproximadamente de un 40% y GtrABC de un 30% de la actividad de transporte, por lo que debe existir al menos otro sistema de transporte de glutamato en esta cianobacteria.

En cuanto a otras ORFs del cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que fueron escogidas para su estudio en base a su homología con sistemas de transporte, concretamente *slr0401* y *slr1257* (Tabla 3), no tenemos ningún dato para concluir que la *slr1257* sea necesaria para el transporte de aminoácidos, al menos en las condiciones ensayadas, mientras que de la *slr0401* no se obtuvieron mutantes segregados. Se ha demostrado recientemente que la *slr1257* determina un canal de K⁺ cuya relación con algunas permeasas de aminoácidos puede derivarse de que es un "receptor" de glutamato, habiéndose denominado *gluR0* (Chen *et al.*, 1999).

El análisis comparativo de la secuencia de los genomas de siete organismos procarióticos, concretamente de dos bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *Haemophilus influenzae*), dos bacterias Gram-positivas (*Mycoplasma genitalium* y *M. pneumoniae*), una cianobacteria (*Synechocystis* sp. PCC 6803) y una arqueobacteria (*Methanococcus jannaschii*), ha puesto de manifiesto que el número de genes implicados en sistemas de transporte en bacterias es aproximadamente proporcional al tamaño del genoma. Son excepciones la cianobacteria y la arqueobacteria, en las que el porcentaje es dos veces inferior, siendo en *Synechocystis* sp. PCC 6803 un 4,7% del total de genes de su cromosoma (Paulsen *et al.*, 1998; Saier, 1998). Teniendo en cuenta, además, que de estos estudios se deduce que el número de transportadores de iones inorgánicos en esta cianobacteria es entre dos y tres veces superior al número de transportadores para compuestos orgánicos, en *Synechocystis* sp. debe existir sólo un grupo relativamente pequeño de genes cuyos productos estén implicados en el transporte de compuestos orgánicos, incluidos los aminoácidos. En nuestro estudio se ha podido asignar una función de transporte de aminoácidos a nueve genes de los analizados, que junto con los dos descritos anteriormente hacen un total de once; por otra parte, una o varias de las ORFs todavía sin función conocida deben estar implicadas en el transporte de glutamato. La existencia de un bajo número de genes implicados en el transporte de aminoácidos es consistente con la observación de que los transportadores sean relativamente de baja especificidad.

De las diversas ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que determinan proteínas homólogas a transportadores, la relación encontrada entre los sistemas de transporte

"tipo ABC" y los sistemas de transporte secundarios del tipo de los de MFS, es aproximadamente de 10:1. *Synechocystis* sp. normalmente vive en charcas de agua dulce donde la concentración de nutrientes es en general muy baja. Las permeasas energetizadas por medio de la hidrólisis de ATP ("tipo ABC") permiten una acumulación de sustrato en contra de gradiente de concentración mucho mayor de lo que permiten las energetizadas mediante la fuerza protón motriz (como muchas del tipo MFS), por lo que normalmente son sistemas con más alta afinidad por el sustrato. Por lo tanto, el nicho ecológico en el que se encuentran estas cianobacterias podría explicar la distribución de los distintos tipos de permeasas observada en *Synechocystis* sp. (Saier, 1998). Respecto al transporte de aminoácidos, nosotros hemos encontrado dos sistemas tipo ABC (Bgt y Nat) y dos sistemas de la categoría de facilitadores tipo portador, aunque no de la superfamilia MFS, el GltS y el Gtr. No obstante, la participación de una proteína de unión de sustrato en el sistema Gtr podría aportar una afinidad relativamente alta al mismo (Jacobs *et al.*, 1996).

Con los datos presentados en este trabajo, junto con lo publicado por otros autores hasta el momento, podemos hacer una breve reflexión acerca del papel que desempeñarían los transportadores de aminoácidos en *Synechocystis* sp. PCC 6803. El sistema Nat no sólo consigue recapturar los aminoácidos neutros que debido a su naturaleza hidrofóbica podrían perderse con facilidad del interior celular mediante difusión (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1997), sino que también es la vía de transporte de un posible nutriente como la prolina (discutido más adelante). El sistema Bgt también tiene un importante papel en el paso al interior celular de un nutriente, la arginina (discutido más adelante). En cuanto al papel de los sistemas GltS y Gtr, desconocemos cual podría ser la explicación más razonable para que esta cianobacteria mantenga sistemas de transporte de glutamato de tan alta actividad, siendo además destacable que en otras cianobacterias el transporte de glutamato no sea tan activo (Montesinos *et al.*, 1997).

La aportación más importante de nuestros estudios al campo de los sistemas de transporte en organismos cuyos genomios están secuenciados, y que por lo tanto pueden ser comparados, ha sido mejorar la definición de los sustratos de transportadores con alto grado de similitud, cuya especificidad generalmente sólo se ha definido en bacterias como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Así, mientras que Nat parece ser un sistema general de transporte de aminoácidos neutros, el sistema conocido con mayor grado de similitud con Nat, el sistema Bra de *Pseudomonas aeruginosa*, es un transportador de aminoácidos neutros de cadena lateral ramificada, alanina y treonina. Por otra parte, Bgt es un transportador de aminoácidos básicos (para los que muestra mayor afinidad y una gran actividad) y glutamina, pero su mayor grado de similitud es con transportadores de glutamina. Finalmente, el sistema

Gtr de transporte de glutamato es homólogo en sus componentes de membrana al sistema TRAP de transporte de dicarboxilatos, mientras que su proteína de unión de sustrato muestra un mayor grado de similitud con proteínas de unión de glutamina, y sólo en segundo lugar con proteínas de unión de glutamina/glutamato/asparragina/aspartato. Sólo el sistema GltS parece tener la misma especificidad que sus homólogos de otras bacterias.

4.3. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

La segunda parte de este trabajo se ha centrado en la investigación de aspectos relacionados con la degradación de los aminoácidos prolina y arginina (y ornitina) en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

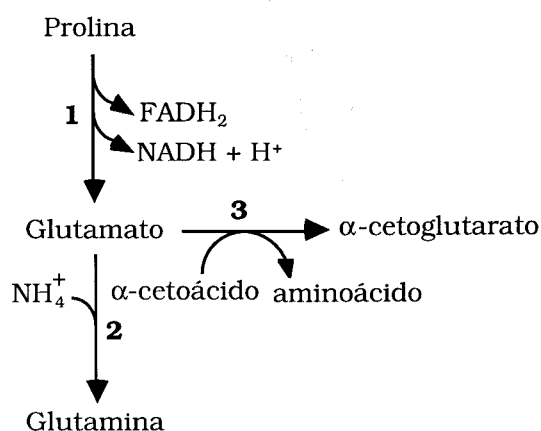


Figura 38. Representación esquemática de la ruta de catabolismo de la prolina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Enzimas: **1**, prolina oxidasa (producto del gen *putA*, inactivado en la estirpe CSMJ15); **2**, glutamina sintetasa; **3**, transaminasas.

Con respecto al estudio del catabolismo de la prolina en esta cianobacteria, se ha identificado el gen *putA* que determina la prolina oxidasa. Esta enzima está implicada en la formación de glutamato dependiente de prolina. El paso de prolina a glutamato es esencial para proporcionar el nitrógeno necesario para el crecimiento de *Synechocystis* sp. a expensas de prolina, ya que el mutante CSMJ15 (*putA*) no crecía con prolina como única fuente de nitrógeno. La Figura 38 presenta un esquema de la ruta de catabolismo de la prolina que se deduce de nuestros estudios en la estirpe PCC 6803, donde, además de la producción de glutamato, se observaba la formación de glutamina y de α -cetoglutarato.

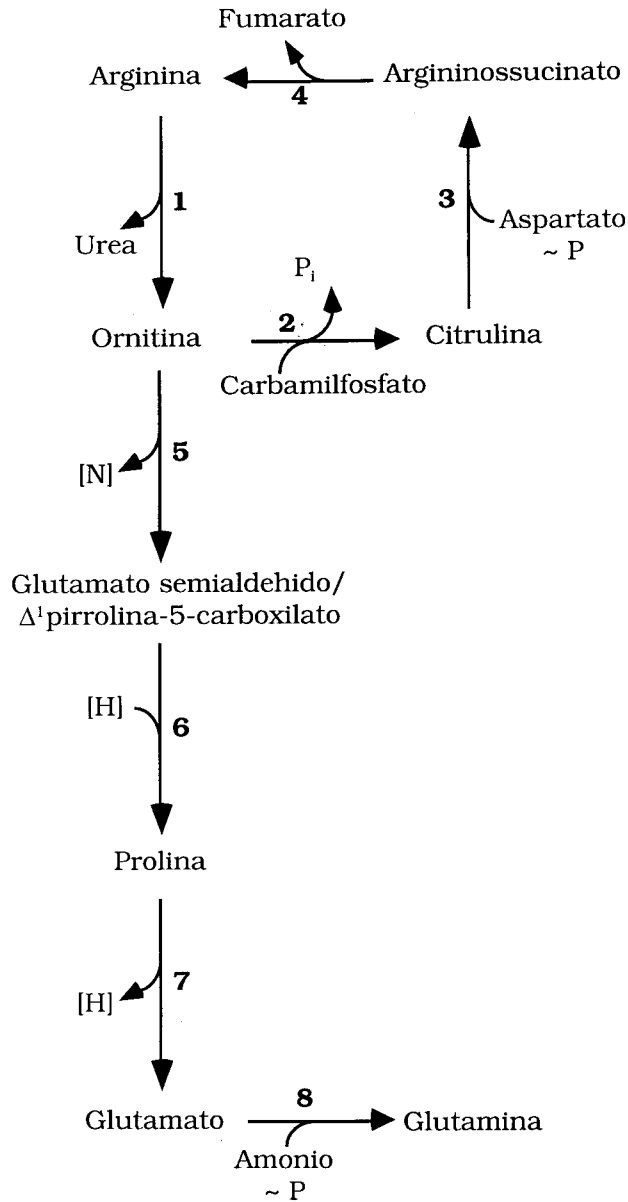


Figura 39. Representación esquemática de la principal ruta de catabolismo de la arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

[H], poder reductor (normalmente en forma de NADH, reacción 6, o de FADH₂ y NADH, reacción 7); [N], nitrógeno recuperado por medio de una reacción de transaminación (normalmente con α -cetoglutarato como aceptor); ~P, reacción que requiere energía (proporcionada por la hidrólisis de ATP). Enzimas: **1**, arginasa; **2**, ornitina transcarbamilasa (producto del gen *argF*, inactivado en la estirpe CSMJ1); **3**, argininossucinato sintetasa; **4**, argininossucinato liasa; **5**, ornitina transaminasa; **6**, Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa (producto del gen *proC*, inactivado en la estirpe CSMJ39b); **7**, prolina oxidasa (producto del gen *putA*, inactivado en la estirpe CSMJ15); **8**, glutamina sintetasa.

La arginina es otro aminoácido objeto de catabolismo en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Experimentos *in vivo* en los que las células de dicha cianobacteria se suplementan con aminoácidos marcados radiactivamente han sugerido el esquema mostrado en la Figura 39 como la posible vía operativa en esta cianobacteria para el catabolismo de la arginina.

La [^{14}C]citrulina es uno de los productos más abundantes entre los que aparecen marcados a partir de la [^{14}C]arginina. Sin embargo, la producción de [^{14}C]ornitina, reacción catalizada por la arginasa, parece ser el paso inicial en la degradación de arginina, siendo la [^{14}C]citrulina sintetizada posteriormente a partir de [^{14}C]ornitina mediante la acción de la ornitina transcarbamilasa anabólica. Esta afirmación se basa en tres observaciones:

1- Los productos que se generan a partir de la [^{14}C]ornitina suministrada extracelularmente son los mismos que los generados a partir de la [^{14}C]arginina (Figura 22).

2- La formación de [^{14}C]citrulina a partir de [^{14}C]arginina se reduce notablemente en la estirpe CSMJ1 (mutante insercional de la ORF *sl10902* carente de actividad ornitina transcarbamilasa) (Figura 29).

3- En experimentos en los que las células se incubaban con [^{14}C]arginina durante 15 segundos no se observaba formación de [^{14}C]citrulina, pero sí de [^{14}C]ornitina (Figura 21).

Sin embargo, al incubar las células con [^{14}C]arginina durante 15 minutos hay relativamente poca acumulación de radiactividad en forma de [^{14}C]ornitina, como se ha observado en este trabajo en numerosos experimentos. Esto podría ser consecuencia de la alta actividad ornitina transcarbamilasa que presentan estos organismos y, al menos en parte, también de una inhibición por ornitina del primer paso de catabolismo de la arginina.

La producción de [^{14}C]citrulina y de [^{14}C]argininosuccinato a partir de la [^{14}C]ornitina derivada de la [^{14}C]arginina podría parecer representar un ciclo fútil, ya que el argininosuccinato ha de liberar arginina por acción de la argininosuccinato liasa (enzima de la ruta de biosíntesis de la arginina), cerrando una forma de ciclo de la urea. Sin embargo, si la ruta propuesta estuviera involucrada en el metabolismo de los gránulos de cianoficina, compuestos de arginina y aspartato, el funcionamiento de ese ciclo explicaría cómo se hace disponible para el metabolismo celular el nitrógeno presente en la molécula de aspartato, ya que su grupo amino se liberaría en forma de urea. La capacidad de degradar arginina parece expresarse constitutivamente en *Synechocystis* sp. PCC 6803, ya que el catabolismo de la arginina no exige el crecimiento previo de las células en medios suplementados con dicho aminoácido. Esto sugiere que la maquinaria de degradación de la arginina tiene un papel independiente de la

disponibilidad de arginina como nutriente en el medio externo. Obviamente, éste podría ser un papel en el metabolismo de la arginina y del aspartato liberados de los gránulos de cianoficina.

Synechocystis sp. PCC 6803 también expresa constitutivamente una ureasa (Valladares *et al.*, 1995), enzima que libera dos moléculas de amonio y una de CO₂ a partir de una molécula de urea. En consonancia con esto, se ha demostrado en *Synechocystis* sp. PCC 6308 que la descomposición de la [¹⁴C]urea derivada de la [¹⁴C]arginina libera [¹⁴C]CO₂ (Weathers *et al.*, 1978).

En el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han encontrado dos ORFs, *sll0228* y *sll1077*, cuyos productos hipotéticos muestran homología con arginasas y con enzimas similares a las arginasas de diferentes fuentes biológicas. Se ha hecho predicción de que sus productos corresponderían a una arginasa y una agmatinasa, respectivamente (Kaneko *et al.*, 1996). Sin embargo, los mutantes generados por inserción en cada una de estas ORFs que hemos aislado han mostrado que ninguna de ellas es responsable de la actividad arginasa detectada en *Synechocystis* sp. PCC 6803. La ORF *sll0228*, sin embargo, es responsable de la actividad agmatinasa de dicho organismo, representando por tanto un gen *speB*, al que denominamos *speB1*. Este podría también ser el caso de la *sll1077*, ya que el mutante de esta ORF presenta una disminución de dicha actividad, mostrando tan solo el 69% de la actividad encontrada en la estirpe silvestre, por lo que la denominamos *speB2*. Las arginasas y agmatinasas constituyen un grupo de enzimas multiméricas, por lo que la agmatinasa de *Synechocystis* sp. podría estar formada también por varias subunidades, una fundamental constituida por el producto de la ORF *sll0228* y otra, determinada por la ORF *sll1077*, que potenciaría dicha actividad aunque no fuera absolutamente necesaria para ella. Las arginasas y proteínas similares a las mismas constituyen una familia de proteínas en la que, en base a sus secuencias, se distinguen dos grandes grupos (Perozich *et al.*, 1998). De hecho, las secuencias de los polipéptidos deducidos de las ORFs *sll0228* y *sll1077* situarían a éstas en el grupo de las enzimas relacionadas con las arginasas, que incluyen agmatinasas, formiminoglutamasas y proclavaminato amidino hidrolasas, más que al de las verdaderas arginasas.

Recientemente se ha descrito un pequeño polipéptido de *Synechocystis* sp. PCC 6803 denominado "L-arginine metabolizing enzyme" que posee actividad arginasa (Gau y Pistorius, 1997). Este polipéptido es el producto de la ORF *sml0007* y muestra homología con los polipéptidos PsbY del fotosistema II de plantas superiores (Gau *et al.*, 1998). En *Synechocystis* sp. PCC 6803 podría ser responsable de la producción de [¹⁴C]ornitina a partir de [¹⁴C]arginina observada *in vivo*.

Además de la arginasa, las otras tres enzimas que se requieren para el funcionamiento del ciclo de la urea son la ornitina transcarbamilasa, la

argininosuccinato sintetasa y la argininosuccinato liasa. Estas enzimas pertenecen a la ruta biosintética de la arginina, por lo que deben ser expresadas normalmente en las células y, de hecho, han sido detectadas en cianobacterias (Gupta y Carr, 1981; Holm-Hansen y Brown, 1963; Lindblad, 1992; Troshina *et al.*, 1997). Por otro lado, no se ha encontrado ninguna ORF en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuyo producto hipotético sea homólogo a las arginina deaminasas hasta ahora descritas en otros organismos. Por lo tanto, hasta el momento se desconoce la vía por la que son generados en el mutante *argF* el [^{14}C]argininosuccinato y un bajo nivel de [^{14}C]citrulina a partir de la [^{14}C]arginina (Figura 29).

La segunda parte de la ruta de la arginasa, en la que se genera glutamato a partir de la ornitina, parece ser operativa en *Synechocystis* sp., ya que la producción de [^{14}C]glutamato desde [^{14}C]arginina y [^{14}C]ornitina era evidente en nuestros experimentos (Figuras 20 y 22). Otro metabolito producido tanto a partir de la arginina como de la ornitina era la prolina. Ya que ninguna ORF del cromosoma de la estirpe PCC 6803 determina un producto homólogo a las ornitina ciclodeaminasas presentes en otros organismos (Kaneko *et al.*, 1996), la conversión de ornitina en glutamato implicaría un primer paso de transaminación que originara glutamato semialdehído/ Δ^1 pirrolina-5-carboxilato. Esta reacción de transaminación podría ser catalizada por la *N*-acetilornitina aminotransferasa (producto del gen *argD* de la ruta biosintética de arginina) utilizando α -cetoglutarato como aceptor del grupo amino transferido ya que en otras bacterias como *E. coli* (Billheimer *et al.*, 1976) y *Pseudomonas aeruginosa* (Voellmy y Leisinger, 1975) se ha descrito que esta enzima es capaz de usar ornitina como sustrato. Sin embargo, el análisis de los productos resultantes del catabolismo de arginina y de ornitina en el mutante CSMJ16a (*argD*) sugieren que ArgD no representa la aminotransferasa que participa en la degradación de ornitina en *Synechocystis* sp. (Figuras 32 y 33). El gen que determina la enzima responsable de esta transaminación no ha sido identificado todavía, ya que en el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 no aparece ninguna otra ORF, aparte de la *slr1022* analizada (gen *argD*), que sea homóloga a ornitina transaminasas de otros organismos.

El siguiente paso sería la formación de glutamato a partir de Δ^1 pirrolina-5-carboxilato. La ORF *slr1561*, gen *putA* (prolina oxidasa), se requiere para la generación de [^{14}C]glutamato a partir de [^{14}C]prolina (Figura 18), [^{14}C]ornitina (Figura 31) o [^{14}C]arginina (Figura 30). PutA podría actuar como Δ^1 pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa para dar glutamato. Sin embargo, en el catabolismo de la [^{14}C]arginina y de la [^{14}C]ornitina también se produce [^{14}C]prolina, por lo que la reducción de Δ^1 pirrolina-5-carboxilato a prolina podría representar un paso intermedio en la ruta degradativa de la ornitina (Figura 39). El análisis del efecto de la inactivación de *proC* en el catabolismo de la arginina y de la ornitina apoyaba esta posibilidad, ya que disminuye

la formación de [¹⁴C]prolina, [¹⁴C]glutamato y [¹⁴C]glutamina a partir de [¹⁴C]arginina o [¹⁴C]ornitina (Figuras 34 y 35). En *E. coli* y *Pseudomonas putida* también se ha sugerido que la prolina sea un intermediario en la degradación de la ornitina (Schneider *et al.*, 1998; Tricot *et al.*, 1991).

Finalmente, entre los productos del catabolismo de la [¹⁴C]ornitina y de la [¹⁴C]arginina, se observaba glutamina marcada, la cual sería producida a partir del [¹⁴C]glutamato mediante la acción de la glutamina sintetasa.

Es interesante que ninguno de los mutantes del catabolismo de la arginina ensayados mostrara una alteración muy notable en su capacidad de crecimiento con arginina como única fuente de nitrógeno (Tabla 25). Esto indica que la primera reacción, en la que se libera urea, es suficiente para proporcionar una cantidad apreciable de nitrógeno para el crecimiento. No obstante, la mutación del gen *putA*, que cortaría la salida de productos catabólicos de la arginina mediante la ruta de la arginasa, tenía un efecto mayor sobre el crecimiento que la inactivación del gen *argF*, que impediría sólo el funcionamiento del ciclo de la urea.

Aunque la ruta catabólica mostrada en la Figura 39 parece representar la principal vía de degradación de arginina y ornitina en *Synechocystis* sp. PCC 6803, en este organismo debe existir una vía adicional para la formación de [¹⁴C]prolina a partir de [¹⁴C]arginina o [¹⁴C]ornitina. Esta afirmación se basa en el hecho de que en los ensayos *in vivo* en los que células del mutante CSMJ39b(*proC*), carente de la enzima Δ^1 pirrolina-5-carboxilato reductasa, se suplementaban con [¹⁴C]arginina o con [¹⁴C]ornitina, seguía observándose la producción de alguna [¹⁴C]prolina. Además, se observaba crecimiento, aunque muy pobre, de esta estirpe en medio BG11 suplementado con arginina 1 mM (datos no mostrados). A pesar de ello, el hecho de que la estirpe CSMJ39b se comporte como auxótrofo indica que tal ruta adicional no debe producir una cantidad sustancial de prolina en células no suplementadas con arginina u ornitina.

En *Synechocystis* sp. PCC 6803 parece existir otra posible vía de degradación de arginina, que conlleva la formación de agmatina por medio de la acción de la arginina descarboxilasa. En el genomio de esta estirpe existen ORFs cuyos productos son homólogos a arginina descarboxilasas y, además, la agmatina se ha observado en algunos de los ensayos de catabolismo de aminoácidos llevados a cabo en este trabajo (Figuras 30 y 31). De todas formas, esta vía alternativa para la degradación de arginina parece ser poco importante en las condiciones experimentales utilizadas.

En resumen, el esquema propuesto para el catabolismo de la arginina combinando la vía de la arginasa y el ciclo de la urea (Figura 39) representa una forma de catabolismo de la arginina poco habitual en bacterias que explicaría no sólo la asimilación de la arginina proporcionada externamente sino también cómo el nitrógeno

almacenado en los gránulos de cianoficina en forma de arginina y de aspartato se hace disponible para el metabolismo biosintético celular.

5. CONCLUSIONES

1. Se han identificado los genes *natC*, *natD* y *natE* correspondientes a las proteínas integrales de membrana, los dos primeros, y a uno de los componentes conservados, el último, del transportador de aminoácidos neutros de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que es de tipo ABC, formado por cinco componentes diferentes.
2. El sistema de transporte de aminoácidos básicos y glutamina de *Synechocystis* sp. PCC 6803 es también de tipo multicomponente, formado al menos por dos proteínas diferentes identificadas en este trabajo, los productos del gen *bgtB*, correspondiente a la proteína de unión de sustrato y a la proteína integral de membrana, y del gen *bgtA*, correspondiente al componente conservado del sistema.
3. El glutamato se incorpora en *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante al menos tres sistemas de transporte dependientes de sodio, habiéndose identificado en este trabajo dos de ellos. Uno es el sistema GltS formado por una proteína de membrana y el otro el sistema Gtr formado por tres componentes: los productos de los genes *gtrA* y *gtrB*, que determinan proteínas integrales de membrana, y el del gen *gtrC*, que determina una proteína de unión de sustrato.
4. El gen *putA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 determina la prolina oxidasa que interviene en el catabolismo de prolina, aminoácido que representa una fuente de nitrógeno limitante para esta cianobacteria.
5. La ruta de catabolismo de la arginina en *Synechocystis* sp. PCC 6803 combina la vía de la arginasa y el ciclo de la urea. La vía de la arginasa, que genera glutamato y glutamina, implica en esta cianobacteria a la prolina como un intermediario, siendo la prolina oxidasa esencial para el funcionamiento de la ruta.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Adams MD y Oxender DL (1989) Bacterial periplasmic binding protein tertiary structures. *J. Biol. Chem.* **264**: 15739-15742

Allen MM y Hutchison F (1980) Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *Arch. Microbiol.* **128**: 1-7

Allen MM, Hutchison F y Weathers PJ (1980) Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J. Bacteriol.* **141**: 687-693

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

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

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

Anderson SL y McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light requiring process. *J. Bacteriol.* **173**: 2761-2767

Atfield GN y Morris CJOR (1961) Analytical separations by high-voltage paper electrophoresis. Amino acids in protein hydrolysates. *Biochem. J.* **81**: 606-614

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

Bednarz J y Schmid GH (1991) Induction of nitrate reductase activity by arginine in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Z. Naturforsch* **46**: 591-596

Billheimer JT, Carnevale HN, Leisinger T, Eckhardt T y Jones EE (1976) Ornithine δ -transaminase activity in *Escherichia coli*: its identity with acetyloronithine δ -transaminase. *J. Bacteriol.* **127**: 1315-1323

Bockholt R, Masepohl B, Kruff V, Wittmann-Liebold B y Pistorius EK (1995) Partial amino acid sequence of an L-amino acid oxidase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301, cloning and DNA sequence analysis of the *aoxA* gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**: 289-293

Bockholt R, Scholten-Beck G y Pistorius EK (1996) Construction and partial characterization of an L-amino acid oxidase-free *Synechococcus* PCC 7942 mutant and localization of the L-amino acid oxidase in the corresponding wild type. *Biochim. Biophys. Acta* **1307**: 111-121

Boyde TRC y Rahmatullah M (1980) Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* **107**: 424-431

Boyer HW y Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472

- Buick R** (1992) The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient archaean lakes. *Science* **255**: 74-77
- Cai Y y Wolk CP** (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequence. *J. Bacteriol.* **172**: 3138-3145
- Cairney J, Higgins CF y Booth IR** (1984) Proline uptake through the major transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions. *J. Bacteriol.* **160**: 22-27
- Carr NG** (1983) Biochemical aspects of heterocyst differentiation and function. En GC Papageorgiou y L Packer, eds, Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp 265-280
- Chapman JS y Meeks JC** (1983) Glutamine and glutamate transport by *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **156**: 122-129
- Chauvat F, de Vries L, Van der Ende A y Van Arkel GA** (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 185-191
- Chen G-Q, Cui C, Mayer ML y Gouaux E** (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**: 817-821
- Collier JL, Brahmsha B y Palenik B** (1999) The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. *Microbiol* **145**:447-459
- Cunin R, Glansdorff N, Piérard A y Stalon V** (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352
- Dassa E y Hofnung M** (1985) Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* **4**: 2287-2293
- Devereux J, Haeberli P y Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic. Acids. Res.* **12**: 387-395
- Driessen AJM, Poolman B, Kiewiet R y Konings WN** (1987) Arginine transport in *Streptococcus lactis* is catalyzed by a cationic exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6093-6097
- Elhai J y Wolk CP** (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138
- Flores E y Herrero A** (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En DA Bryant, ed, The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 487-517
- Flores E y Muro-Pastor AM** (1990) Mutational and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **154**: 521-527
- Flores E, Herrero A y Guerrero MG** (1982) Production of ammonium dependent on basic L-amino acids by *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **131**: 91-94
- Forward JA, Behrendt MC, Wyborn NR, Cross R y Kelly DJ** (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the

dctPQM genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**: 5482-5493

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

Gau AE y Pistorius EK (1997) Investigation of a manganese requiring L-arginine metabolizing enzyme in photosystem II complexes of *Synechocystis* PCC 6803. IX International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Abstracts, p 138

Gau AE, Thole HH, Sokolenko A, Altschmied L, Herrmann RG y Pistorius EK (1998) PsbY, a novel manganese-binding, low-molecular-mass protein associated with photosystem II. *Mol. Gen. Genet.* **260**: 56-68

Gilson E, Alloing G, Schmidt T, Claverys JP, Dudler R y Hofnung M (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.* **7**: 3971-3974

Glazer AN (1984) Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 29-51

Gupta M y Carr NG (1981) Enzyme activities related to cyanophycin metabolism in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* spp. *J. Gen. Microbiol.* **125**: 17-23

Hanahan D (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580

Hancock REW y Carey AM (1980) Protein D1-A glucose inducible, pore forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 105-109

Heller KB, Lin ECC y Wilson TH (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**: 274-278

Herdman M, Janvier M, Waterbury JB, Rippka R, Stanier RY y Mandel M (1979) Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 63-71

Herrero A y Flores E (1990) Transport of basic amino acids by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **265**: 3931-3935

Higgins CF y Ames GF-L (1981) Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6038-6042

Higgins CF, Gallagher MP, Mimmack ML y Pearce SR (1988) A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bio Essays* **8**: 111-116

Higgins CF, Hiles ID, Whalley K y Jamieson DJ (1985) Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* **4**: 1033-1040

Higgins CF, Hyde SC, Mimmack MM, Gileadi U, Gill DR y Gallagher MP (1990) Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 571-592

Hiles ID, Gallagher MP, Jamieson DJ y Higgins CF (1987) Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **195**: 125-142

Holm-Hansen O y Brown GW, Jr (1963) Ornithine cycle enzymes in the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Plant Cell Physiol.* **4**: 299-306

Holmes DS y Quigley M (1981) A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197

Hood W y Carr NG (1971) Apparent lack of control by repression of arginine metabolism in blue-green algae. *J. Bacteriol.* **107**: 365-367

Hoshino T y Kose K (1989) Cloning and nucleotide sequence of *braC*, the structural gene for the leucine-, isoleucine-, and valine-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **171**: 6300-6306

Hoshino T y Kose K (1990a) Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO *bra* genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system. *J. Bacteriol.* **172**: 5531-5539

Hoshino T y Kose K (1990b) Genetic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO high-affinity branched-chain amino acid transport system by use of plasmids carrying the *bra* genes. *J. Bacteriol.* **172**: 5540-5543

Jacobs MHJ, van der Heide T, Driessen AJM y Konings WN (1996) Glutamate transport in *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by a novel binding protein-dependent secondary transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12786-12790

Jahns T, Schäfer U y Kaltwasser H (1995) Heat-stable ureases from two filamentous cyanobacteria. *Microbiology* **141**: 737-741

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M y Tabata S (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136

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

Kobashi K, Kumaki K y Hase J (1971) Effect of acyl residues of hydroxamic acids on urease inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **227**: 429-441

Kyte J y Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132

Labarre J, Thuriaux P y Chauvat F (1987) Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J. Bacteriol.* **169**: 4668-4673

Lindblad P (1992) Ornithine cycle in *Nostoc* PCC 73102. Occurrence and localization of ornithine carbamoyl transferase, and the effects of external carbon and ornithine on nitrogenase activity and citrulline synthesis. *Physiol. Plant.* **84**: 275-282

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275

Lüthi E, Baur H, Gamper M, Brunner F, Villeval D, Mercenier A y Haas D (1990) The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. *Gene* **87**: 37-43

Mackerras AH, de Chazal NM y Smith GD (1990) Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2057-2065

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

Maloney PC y Wilson TH (1996) Ion-coupled transport and transporters. En FC Neidherdt, R Curtis, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter y HE Umbarger, eds, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1130-1148

Mao B, Pear MR, McCammon JA y Quijcho FA (1982) Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's-flytrap" model. *J. Biol. Chem.* **257**: 1131-1133

Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL y Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**: 206-210

Marsh JL, Erfle M y Wykes EJ (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**: 481-485

Martel A, Jansson E, García-Reina G y Lindblad P (1993) Ornithine cycle in *Nostoc* PCC 73102. Arginase, OCT and arginine deiminase, and the effects of addition of external arginine, ornithine, or citrulline. *Arch. Microbiol.* **159**: 506-511

Miller DM, Olson JS, Pflugrath JW y Quijcho FA (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **258**: 13665-13672

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

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

Montesinos ML, Muro-Pastor AM, Herrero A y Flores E (1998) Ammonium/methylammonium permeases of a cyanobacterium. *J. Biol. Chem.* **273**: 31463-31470

Montesinos, ML (1997) Sistemas de transporte de aminoácidos, amonio y urea en cianobacterias. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.

Morris DR y Pardee AB (1966) Multiple pathways of putrescine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3129-3135

Mourez M, Hofnung M y Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J.* **16**: 3066-3077

Muro-Pastor AM, Maloy S (1995) Proline dehydrogenase activity of the transcriptional repressor PutA is required for induction of the *put* operon by proline. *J Biol Chem.* **270**: 9819-27

Neilson AH y Larsson T (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* **48**: 542-553

Nichols JM y Adams DG (1982) Akinetes. En NG Carr y BA Whitton, eds, The biology of cyanobacteria. Oxford, Blackwell, pp 387-412

Nikaido H (1993) Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 581-589

- Pakrasi HB, Williams JG y Arntzen CJ** (1988) Targeted mutagenesis of the *psbE* and *psbF* genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. *EMBO J.* **7**: 325-332
- Paulsen IT, Sliwinski MK y Saier MH, Jr** (1998) Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* **277**: 573-592
- Pearson WR y Lipman DJ** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448
- Perozich J, Hempel J y Morris SM, Jr** (1998) Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**: 23-37
- Postma PW, Lengeler JW y Jacobson GR** (1996) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems. *En FC Neidherdt, R Curtis, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter y HE Umbarger, eds, Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1149-1174*
- Quiocho FA** (1990) Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high-affinity active transport systems in bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326**: 341-351
- Quiocho FA y Ledvina PS** (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**: 17-25
- Ratner S** (1962) Transamidinase. *Methods Enzymol.* **5**: 843-848
- Richter R, Hejazi M, Kraft R, Ziegler K y Lockau W** (1999) Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin). *Eur. J. Biochem.* **263**: 163-169
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M y Stanier RY** (1979) Generic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61
- Sack JS, Saper MA y Quiocho FA** (1989) Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J. Mol. Biol.* **206**: 171-191
- Saier MH, Jr** (1998) Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *En RK Poole, ed, Advances in Microbial Physiology. Academic Press, San Diego, pp 81-136*
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Saurin W, Köster W y Dassa E** (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **12**: 993-1004
- Schneider BL, Kiupakis AK y Reitzer LJ** (1998) Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4278-4286
- Shestakov SV y Khyen NT** (1970) Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **107**: 372-375

- Simon RD** (1971) Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 265-267
- Simon RD** (1973) Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* **114**: 1213-1216
- Simon RD** (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. En P Fay y C Van Baalen, eds, *The cyanobacteria*. Amsterdam y New York: Elsevier, pp 199-225
- Simon RD y Weathers P** (1976) Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **420**: 165-176
- Singh S y Bisen PS** (1994) Arginine metabolism in cyanobacterium *Anabaena cycadeae*: regulation of arginine uptake and arginase by ammonia. *Current Microbiol.* **29**: 49-52
- Smart LB, Bowlby NR, Anderson SL, Sithole I y McIntosh L** (1994) Genetic manipulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Development of strains lacking Photosystem I for the analysis of mutations in Photosystem II. *Plant Physiol.* **104**: 349-354
- Spence DW y Stewart WDP** (1986) Proline inhibits N₂-fixation in *Anabaena* 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 940-946
- Stanier RY y Cohen-Bazire G** (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 225-274
- Stirling DA, Hulton CSJ, Waddell L, Park SF, Stewart GSAB, Booth IR y Higgins CF** (1989) Molecular characterization of the proU loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems. *Mol. Microbiol.* **3**: 1025-1038
- Surber MW y Maloy S** (1998) The PutA protein of *Salmonella typhimurium* catalyzes the two steps of proline degradation via a leaky channel. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**: 281-287
- Tandeau de Marsac N** (1994) Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. En DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 825-842
- Tandeau de Marsac N y Houmard J** (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 119-190
- Thiel T** (1988) Transport of leucine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **149**: 466-470
- Tomii K y Kanehisa M** (1998) A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res.* **8**: 1048-1059
- Trias J y Nikaido H** (1990) Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**: 15680-15684
- Tricot C, Stalon V y Legrain C** (1991) Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* mutants affected in arginine, ornithine and citrulline catabolism: function of the arginine oxidase and arginine succinyltransferase pathways. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2911-2918

- Troshina O, Jansson E y Lindbald P** (1997) Ornithine cycle in *Nostoc* PCC 73102: presence of an *in vitro* functional argininosuccinate lyase. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 75-81
- Valladares A, Herrero A y Flores E** (1995) The assimilation of urea by cyanobacteria. *European Workshop Mol. Biol. Cyanobacteria, 3rd*, Sevilla, España, p 71
- Vázquez-Bermúdez MF, Herrero A y Flores E** (2000) Uptake of 2-oxoglutarate in *Synechococcus* strains transformed with the *Escherichia coli* *kgtP* gene. *J. Bacteriol.* **182**: 211-215
- Vega-palas MA, 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
- Voellmy R y Leisinger T** (1975) Dual role for N²-acetylornithine 5-aminotransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in arginine biosynthesis and arginine catabolism. *J. Bacteriol.* **122**: 799-809
- Weathers PJ, Chee HL y Allen MM** (1978) Arginine catabolism in *Aphanocapsa* 6308. *Arch. Microbiol.* **118**: 1-6
- Willians JGK** (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering. *Methods Enzymol.* **167**: 766-778
- Wolk CP, Ernst A y Elhai J** (1994) Heterocyst metabolism and development. En DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 769-823
- Yanish-Perron C, Viera J y Messing J** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119
- Ziegler K, Diener A, Herpin C, Richter R, Deutzmann R y Lockau W** (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *Eur. J. Biochem.* **254**: 154-159
- Zuther E, Schubert H y Hagemann M** (1998) Mutation of a gene encoding a putative glycoprotease leads to reduced salt tolerance, altered pigmentation, and cyanophycin accumulation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **180**: 1715-1722

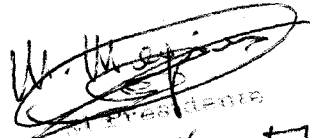
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Ma. María José Quiñero Canas
titulada Transportador de aminoácidos y catabolismo de arginina y prolina en la cianobacteria Synechocystis sp. PCC6803
se acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE con la de (POR UNANIMIDAD)

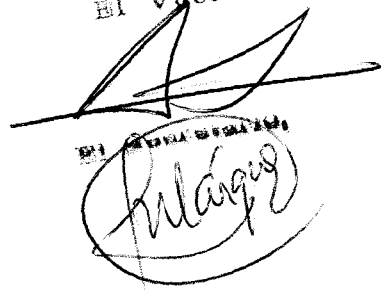
Sevilla, 12 de Mayo

El Vocál,


El Presidente

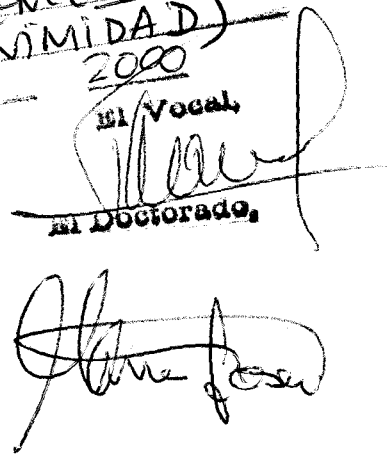


El Vocál,

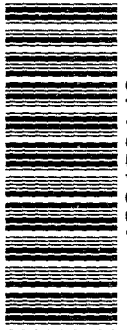

El Vocales

2000
El Vocál,

al Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672168

