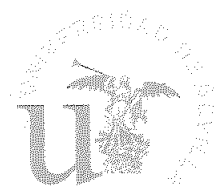


12911586

TD
391



FACULTAD DE BIOLOGÍA
BIBLIOTECA

Transporte de aminoácidos y relaciones intercelulares en la cianobacteria formadora de heterocistos *Anabaena* sp.

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Bioquímica por el Licenciado
Rafael Pernil García

Sevilla, Mayo de 2009

Director

Dr. Enrique Flores García
Profesor de Investigación del C.S.I.C

Directora

Dra. Antonia Herrero Moreno
Profesora de Investigación del C.S.I.C

Tutor

Dr. Fco. Javier Cejudo Fernández
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

rafael.pernil@
ibmf.csic.es

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Que la matrícula de este Título Doctoral
al fin nº 147 número 477 del libro
correspondiente.

Sevilla. 13-05-09

El Jefe del Museo de Teato





*A mi familia,
en especial a mis padres*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de Sevilla, gracias a una beca de Formación de Personal Investigador otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores, el Dr. Enrique Flores y la Dra. Antonia Herrero, por confiar en mí y darme la posibilidad de formarme en su magnífico grupo. Además, quiero agradecerles enormemente su gran dedicación, su trato y el gran esfuerzo realizado en la elaboración y corrección del manuscrito.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a la Dra. Alicia Muro-Pastor su apoyo y todo lo que me ha enseñado a lo largo de este tiempo, así como el haberme permitido, junto con mi directora de tesis, mi incursión en el grupo como alumno interno antes de comenzar la tesis, que fue clave para que decidiera realizar este trabajo.

No puedo pasar por alto todo el grupo que ha formado parte del laboratorio, los que ya terminaron y los que aún siguen entre reactivos y tubos de ensayo. A José Enrique, por haberme ayudado en muchas ocasiones a encontrar soluciones a problemas con las construcciones y por esas charlas de deportes en general y de Fórmula 1 en particular los lunes por la mañana; a Ana, mi compañera de poyata, por ser una magnífica persona y por estar siempre dispuesta a ayudarme con todo lo que le preguntaba; a Silvia, por su ayuda en mis inicios para que comprendiera mejor los transportadores de aminoácidos y por haber hecho posible que haya llegado hasta aquí gracias a los resultados de su tesis; a Javi, por ese espíritu optimista que se contagia y por todas esas celebraciones de cumpleaños en las Pajanosas y El Palmar; a Elvira, por interesarse siempre por cómo me iba todo, tanto en el laboratorio como fuera de él, y por su apoyo y ayuda durante la escritura de este trabajo (y algún que otro masaje para relajar la espalda después de los días tan largos delante del ordenador); a Virginia, mi Vir, por todos los buenos momentos y porque aunque ya no esté en el grupo su esencia sigue formando parte de él; a Rocío, por ser la niña más graciosa y con más arte de Sevilla; a mi Barbi, la gran técnica de nuestro laboratorio, a la que quiero muchísimo, por su cariño y por haber estado siempre pendiente de todo (y espero que siga estándolo); a Vicente, por su inestimable ayuda en muchos experimentos y por haber hecho posible que este trabajo sea lo que es; a Victoria, por los ánimos en la recta final de la escritura y por esas canciones con las que nos deleitaba para disfrute de todos, y por último, a Sergio y Laura, las nuevas adquisiciones del grupo, por haber contribuido de una u otra forma a este trabajo.

También querría mencionar a Ignacio Luque, que aunque tiene su propio grupo, también forma parte del nuestro. Gracias por ser una grandísima persona y poner el punto de humor todos los días. Mención especial a nuestra querida Loly, a la que agradezco su interés durante el transcurso del día por saber cómo nos iba. Asimismo, no quisiera olvidar a los que han venido del extranjero y han compartido una pequeña parte de su vida con el resto del grupo: Sunčana, una bellísima persona con una vitalidad increíble y a la que aprecio mucho; Kerstin, que tomó el testigo de Sunčana y tuve el placer de conocer; Gíselle y Manu, que me dieron algunas clases de argentino para perfeccionar la entonación; Iris, por esas magníficas lecciones para preparar muestras de microscopía electrónica; Mapi, por su encanto y simpatía; Arnaud, que me explicó las ventajas que tiene Nueva York, Nueva Orleans y Las Vegas sobre el resto de ciudades de los EE.UU., y Danny, que me enseñó algunas curiosidades y rarezas del hebreo y el rumano. Por último, quería dar las gracias a su Ilustrísima el Sr. de López y Garrido, por incluirme en la superproducción que lleva preparando minuciosamente desde hace más de 3 años (no se puede dejar ningún detalle al azar), y a Manu el gallego, por haber sabido transmitirme la cultura «gambitera» y por darme la oportunidad de conocer Galicia en todo su esplendor.

Gracias a Carlos Parejo y Rocío Rodríguez por su disponibilidad en todo momento y su gran ayuda con la utilización del cromatógrafo de gases y el HPLC; a Alicia Orea por su apoyo técnico en la utilización del microscopio confocal; a Nuria por su eficiencia en la cocina y por tenerla siempre como los chorros del oro; a Juanma por preparar muchos de los potingues; a Setefilla por su ayuda en la determinación de la actividad nitrogenosa en mis inicios; a Pepa por interesarse siempre por cómo iba la tesis; a Francisco, el auténtico de «Benacajón»; a Martín por su disposición y amabilidad, y a los miembros del Servicio de Informática: Rafa, Carlos, Marco, Rocío, Leticia y Juanjo (aunque no oficialmente), por su ayuda cuando surgía un problema informático y por su paciencia con la impresión de la tesis. Mención especial para Carlos, el «pataliebre», Marco, Juanjo y Francisco, con los que, además, comparto una buena amistad. Gracias a los miembros de Seguridad del centro: Ana, Luis, Javi, Eduardo y Carlos, por dejar que me quedara hasta tarde en el laboratorio cuando era necesario, y a Nacho y Lola por sus bienvenidas todas las mañanas. Quisiera agradecer también a Maribel su ayuda en la Biblioteca y en la solicitud de algunos artículos.

En relación con la escritura de la tesis en la Biblioteca no quiero pasar por alto a mis compañeros de fatiga, con los que me echaba unas risas (en silencio) de vez en cuando para desconectar. A Pablo, por su ayuda y sus consejos cuando empecé a escribir; a Caria, por esa vitalidad que es salud para los demás y por esas fiestas en la mejor terraza de Triana; a Sandra, por su interés en saber cómo iba la tesis y darme ánimos cuando me desesperaba con algo que no terminaba de salir bien; a Jorge, el «perfumado» mayor del Reino, el mejor compañero de congresos de todo el centro; al «primo» Nando, el «primaster», por esas magníficas clases de murciano refinado, y a Kerstin, que se ha unido al grupo de sufridores recientemente, por las charlas sobre la etapa PostDoc.

También quisiera dar las gracias a todos los compañeros del IBVF que me han acompañado durante estos años. Los del L11: Rocío Drake, Isa, Rosana, Fede, José Román y Rosa; los del L8: Paula, Sandy, Ángel Mérida, Mauro, Alfonso y Jaime; los del L6-7: Luci, Baldo, María Ceballos, José Manuel, Pilar, Leo, Elena, Mariana, Irina, Emilio, Fernando, Tania (no te cambies más de grupo que si no me estropeas la llista) y Pablo; los del L1 (¿este cuál es?) al L5: Esther, Manolo (aunque ahora esté con la competencia), Lidia (y Jero), José Antonio del Campo, Raúl, Anita, Lorena, Ruth (la riojana), Ale, PPL, Joaquín, Maribel, Miguel, Rebeca, Pilar, Marta, Rafa, Rosana, Anabel, Cristina, Espe, José Manuel (el menor del Reino), Vicente, Jonathan, Ornella, Franchu (gracias por esos ajustes perfectos con el Origin™), Estrella, Fran, Fernando y Manolo Hervás; los del L12: Juan, Manolo y Bea Cano; los del L13: Bea Castrillo (gracias por ser la primera en ofrecerte a ayudar y por el suministro de avituallamiento en las noches de verano), Raquel, Toba (el «babusha»), Germán, Tiziana, Marina, Tomás y Tere; a Irene, Inma y Leticia del L14 y, del L15, a Carmen y Fran (el «9800GT»), que ya mismo se une al gremio de los sufridores de la Biblioteca. Por último, también querría mencionar a Silvia del ICMSE y al resto de personas del centro que haya podido olvidar al escribir esta lista. Gracias a todos por haber hecho que este tiempo pasase más rápido.

Aunque ya haya sido nombrada, quisiera hacer una mención especial a Rocío Drake y su pandilla, en especial, Ale, Dani (y Bernd, el Cigala alemán), Trini, Salva, Rorrito, José Luis, Houda, Pedro y Raúl. Gracias a todos por esas fiestas de disfraces (por gentileza de Vir) y de cumpleaños, barbacoas, capeas y muchas horas en el Real de la Feria de Sevilla.

Siguiendo con la gente de Sevilla, también querría mencionar a Irene, mi pequeña croqueta, a la que quiero mucho por ser la niña más alegre y simpática de Sevilla, y a toda su pandilla, incluida Julia, Raúl, Laura, Paco, Laurita, José Luis, Fran, Espe, Isra, Yoli, Visto y Yeral (espero que no haya olvidado a nadie). Gracias a todos por ese pedazo de fin de semana en la sierra cordobesa.

También quiero agradecer al grupo de amigos de Elvira y Carla, en especial a Oli (aunque se vaya a targar... por un buen motivo...), Alberto, Isa y Manolo, y a los amigos de Javi, en especial a Mercedes, Alberto «cabeza» el del LN₂ (y Rafa), Javi gallego, Marta, Carlos, Nacho, Toba... por su compañía en cumpleaños y en todas esas magníficas barbacoas en el campo, la playa o donde fuera.

A mi primo Dani (el «Látin») y a Alberto (el «volador»), con los que he compartido piso durante casi todo el tiempo que ha durado la tesis mediando entre el bien y el mal... Gracias a los dos por todo este tiempo de convivencia, y a Alberto por todas las salidas en las que nunca conseguíamos que el «Látin» se apuntara.

A mi prima Araceli y a los nuevos odontólogos, en especial a Ángela, Carmen, Javi (sigue sin ser capaz, y mira que ha pasado tiempo...) y María. Gracias por un finde que se me está viniendo ahora a la cabeza, por esos veranitos y por todas las noches de Puerto de Indias y/o Consorcio... al fresco.

A todos mis amigos de la Cuenca Minera en general y de Nerva en particular, porque siempre han estado ahí, en lo bueno y en lo malo, y porque aunque estemos cada uno por un sitio diferente no perdemos el contacto y una vez al año, por lo menos, coincidimos todos para revivir los mejores San «Bartolos». Gracias a Chico, Javi, Raúl (PP), Fuen, Lolo (y Eva), David Payán (PP), Manolín, José Payán, Vitan, Jesús el «pastelito», Supe, Sutilo, Óscar (tu Pentium sigue siendo más lento...), Rafa, Miguelito, Joserra, Guere, Wladi el «cufiao» (que aunque no sea de Nerva como si lo fuera), Rorro, Jorge, Fran, Boza, Samuel, K1, K2, Rocío, Laura Vázquez, Laura Laureano, «dupe» Mora (por ese interés por saber si había descubierto la bacteria del dinero), los Limones (Juanma, Manuel y Patxi), Felisa, Raquel, Elena, Oliva, Mirella (¿ves como al final se acababa?), la «prima» Olivia, Roland, Javi Casera el «alkantamparo», Chack, Álvaro Vélez el «alkantariya», Solís, Migue, primo Iván, Sthr (gracias por esas charlas de todo y por estar siempre ahí), María José, Che, Diana, Chus, Esther, Fari, Paco, Santi, Fran...

Quiero hacer una mención especial al «Gamba Team», el grupo más ingenioso en la confección de disfraces de Carnaval que tanta fama ha cosechado desde 2004 y que, año tras año, ha intentado superar su primera creación sin éxito, todo hay que decirlo. Gracias a Pardote (PP) la «cigala», Jesús el «langostino», Jorge la «gamba» (auténtica), y al camarón... (ordenados según talla). Gracias a los tres por tantas ideas brillantes a la luz de la Luna (aunque así no tiene tanto mérito), los espectaculares *making off*, y esos bailes con la Banda de Brian que alguien dejó para la posterioridad (origen de esa extraña atracción por los megáfonos). El éxito de este equipo no podría explicarse sin la inestimable ayuda de dos amigos que siempre nos han apoyado en los momentos de máxima creación: Hidalgo (con lo de santo no estoy muy seguro) y Caxi Muri™ (sí, con doble patente, por si a alguien se le pasa algo raro por la cabeza...), que cuando estaban juntos contagiaban ingenio. Y aunque no forme parte de este equipo, también me gustaría dar las gracias a Manolín «Nathan», por esa pedazo de gira portuguesa en la Eurocopa'04 con el tronco-móvil (con la E en fondo azul) repartiendo Caxi Murão Coração (como diría un portugués, *limão e mais*).

A Carmen (PP) (y también al «&») le agradezco haber venido cierto verano a cierta costa andaluza (mejor no dar más detalles) acompañada de Vero, Juani y Nieves, y haber hecho que ese fin de semana fuera inolvidable... e interminable, ¿|verdad neng|? Por supuesto, gracias al Neng por el alojamiento.

Gracias a María José y Nérida por el tiempo que «convivimos» y, en especial, a Inma (gracias de corazón por todo) y María, a la que quiero mucho y espero que le vaya muy bien y le sonría el futuro.

También me gustaría dar las gracias a mi «prima» pequeña Laura por ser una niña encantadora, a la que le tengo mucho cariño y que espero ver muy pronto por el norte o por el sur, y al «hermano» Andrés el cubano, por hacer honor a su cultura y apuntarse a un bombardeo, aparte de ser como pocos.

A todos los amigos de la playa: Orestes, primo Rubén, Juancrí, José Luis, Manolo, Laura, Luis el cordobés, Luis el Isleño, Seba, Luis el portugués, Wichy, Isra (el genuino «cuerpo de leche», también conocido como «bodymilk»), Paola, Dani, Carol, Cristina, Carlos Acitores, Álvaro, Maritrini, Noe, Niko, Samu... Gracias a todos por hacer de cada verano uno irrepetible.

No puedo pasar por alto a Fede, por ser una magnífica persona y un gran amigo que, pese a la distancia, siempre ha estado ahí; a Manolo Portero, el master preferido del universo; a Sara Coca, por su hospitalidad y su simpatía gaditana, y a Saray, por ser una chica estupenda y tener una niña preciosa, Carmen.

Quiero dar las gracias a todos los amigos de Valverde, pero en especial a mi supercuñá Cristina y mis concuñás Mónica y Lucía (y a sus padres), José Luis el «cuesco» (¡qué artista eres, fenómeno!), Juan Guillermo (aunque sea del Barça y prefiera Brugal) y Helena. Gracias a todos por estar siempre ahí y avisarme para los eventos importantes...

Por último, quiero agradecer a mi familia, que son los que más quiero por encima de todo, el haberme apoyado en todo momento y enseñarme que las cosas se consiguen con trabajo, humildad y, sobre todo, fuerza de voluntad. Aprovecho la ocasión para decirles a mis padres lo mucho que los quiero y para darles las gracias a mi abuela María y a mis abuelos que ya no están entre nosotros, a los que no olvido. Para culminar, quien mejor que mi hermano, por todo lo que lo quiero y por ser el mejor amigo de todos.

ÍNDICE

ÍNDICE.

ÍNDICE DE FIGURAS.	ix
ÍNDICE DE TABLAS.	xvii
ABREVIATURAS.	xxi
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Transporte de membrana y sistemas de transporte.	1
1.1.1. Transporte a través de membranas.	1
1.1.2. Clasificación de los sistemas de transporte.	1
1.1.3. Canales o poros.	5
1.1.4. Sistemas de transporte secundario.	6
1.1.5. Sistemas de transporte primario de tipo ABC.	9
1.1.5.1. Componente conservado de unión de ATP.	9
1.1.5.2. Proteínas integrales de membrana.	11
1.1.5.3. Proteína periplásmica de unión de sustrato.	12
1.1.5.4. Organización de los genes que determinan transportadores de tipo ABC.	14
1.1.5.5. Modelo del mecanismo de transporte.	14
1.2. Transportadores de aminoácidos.	15
1.2.1. Generalidades.	15
1.2.2. Portadores secundarios de aminoácidos.	17
1.2.3. Sistemas ABC de transporte de aminoácidos.	19
1.2.3.1. Características generales de la familia PAAT.	19
1.2.3.2. Características generales de la familia HAAT.	20
1.2.3.3. Características generales de la familia QAT.	21
1.2.3.4. Características generales de la familia MUT.	21
1.3. Cianobacterias, asimilación de nitrógeno y heterocistos.	21
1.3.1. Las cianobacterias.	21
1.3.2. Asimilación de nitrógeno en las cianobacterias.	25
1.3.2.1. Asimilación de nitrato y nitrito.	26
1.3.2.2. Asimilación de amonio.	27
1.3.2.3. Asimilación de nitrógeno orgánico.	28
1.3.2.3.1. <i>Asimilación de urea.</i>	28
1.3.2.3.2. <i>Asimilación de aminoácidos.</i>	29
1.3.2.4. Asimilación de dinitrógeno.	29
1.3.2.5. Incorporación de amonio a esqueletos carbonados.	31
1.3.2.6. Regulación de la asimilación del nitrógeno en cianobacterias.	33

1.3.3. El heterocisto.	35
1.3.3.1. Estructura de los heterocistos.	36
1.3.3.2. Adaptaciones metabólicas de los heterocistos.	37
1.3.3.3. Diferenciación de los heterocistos.	38
1.3.3.4. Relaciones intercelulares.	40
1.4. Transporte de aminoácidos en las cianobacterias.	41
1.4.1. Transporte de aminoácidos neutros.	41
1.4.2. Transporte de aminoácidos básicos.	42
1.4.3. Transporte de aminoácidos ácidos.	43
1.4.4. Papel fisiológico de los sistemas de transporte de aminoácidos.	43
1.5. Catabolismo de la alanina.	44
1.6. Objetivos de este trabajo.	46
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	49
2.1. Organismos y condiciones de cultivo.	49
2.1.1. Cianobacterias.	49
2.1.1.1. Estirpes empleadas.	49
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo.	49
2.1.1.3. Determinación de tasas de crecimiento.	50
2.1.1.4. Recogida y lavado de células.	51
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> .	51
2.1.2.1. Estirpes empleadas.	51
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo.	51
2.1.2.3. Recogida y lavado de células.	52
2.2. Determinación de actividades de transporte.	52
2.2.1. Ensayos de transporte de aminoácidos.	52
2.2.2. Ensayos de transporte de ácidos carboxílicos.	53
2.3. Ensayos de catabolismo de alanina.	53
2.4. Determinación de metabolitos.	54
2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC).	54
2.4.2. Determinación de aminoácidos no radiactivos.	54
2.4.3. Determinación de aminoácidos mediante HPLC.	55
2.5. Aislamiento de heterocistos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	55
2.6. Determinación de la actividad alanina deshidrogenasa.	56
2.7. Determinación de parámetros celulares.	56
2.7.1. Determinación de la cantidad de proteína de suspensiones celulares.	56
2.7.2. Determinación de la cantidad de proteínas de heterocistos aislados.	56
2.7.3. Determinación de la cantidad total de clorofila.	57

2.9. Aislamiento y análisis de DNA.	57
2.8.1. Plásmidos utilizados.	57
2.8.2. Aislamiento de DNA.	58
2.8.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .	58
2.8.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias.	59
2.8.3. Estimación de la concentración de DNA.	59
2.8.4. Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.	59
2.8.5. Purificación de fragmentos de DNA embebidos en geles de agarosa.	60
2.8.5.1. Procedimiento del juego de reactivos <i>illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> (GE Healthcare).	60
2.8.5.2. Procedimiento del juego de reactivos <i>Geneclean® II</i> (BIO).	60
2.8.5.3. Congelación y presión.	60
2.8.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación en filtro con sondas radiactivas (análisis de Southern).	60
2.8.6.1. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nailon.	60
2.8.6.2. Hibridación de DNA con sondas radiactivas.	61
2.8.6.3. Detección de la radiactividad.	61
2.8.7. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).	61
2.8.8. Secuenciación del DNA.	63
2.8.9. Tratamientos enzimáticos del DNA.	63
2.8.9.1. Restricción del DNA.	63
2.8.9.2. Desfosforilación del DNA.	63
2.8.9.3. Ligación del DNA.	63
2.8.9.4. Marcaje radiactivo de sondas de DNA.	64
2.9. Métodos genéticos.	64
2.9.1. Vectores para la generación de mutantes de <i>Anabaena</i> sp. mediante recombinación simple.	64
2.9.2. Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante transformación.	65
2.9.3. Transferencia de DNA a <i>Anabaena</i> sp. mediante conjugación.	65
2.10. Microscopía confocal láser para la detección de la proteína testigo GFP.	66
2.11. Otros métodos analíticos.	66
2.11.1. Determinaciones espectrofotométricas.	66
2.11.2. Determinación de la radiactividad en disoluciones conteniendo ³²P.	66
2.12. Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas.	67
3. RESULTADOS.	71
3.1. Sistemas de transporte de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	71
3.1.1. Sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I.	71

3.1.1.1. Actividades de transporte de aminoácidos en las estirpes CSX60, CSX62 y CSS6.	73
3.1.1.2. Identificación e inactivación de los genes <i>natD</i> y <i>natE</i> .	75
3.1.1.3. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSR11, CSRS y CSR4.	81
3.1.2. Sistema de transporte de aminoácidos básicos Bgt.	82
3.1.2.1. Identificación e inactivación del gen <i>bgtA</i> .	84
3.1.2.2. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSS8 y CSR10.	86
3.1.3. Sistema de transporte de aminoácidos ácidos y neutros N-II.	88
3.1.3.1. Inactivación de las ORFs <i>alr4164</i> y <i>alr4166</i> .	88
3.1.3.2. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSR17, CSR8a y CSR8b.	93
3.2. Estudio global de los sistemas de transporte de aminoácidos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	95
3.2.1. Generación y caracterización de mutantes dobles de los sistemas N-I y N-II.	95
3.2.2. Generación y caracterización de un mutante N-I N-II Bgt.	98
3.2.3. Actividades de transporte de aminoácidos en ensayos de competencia.	102
3.2.4. Actividades de transporte para aminoácidos no ensayados previamente.	104
3.2.5. Transporte de aminoácidos en filamentos fragmentados.	107
3.3. Expresión espacial de los sistemas de transporte de aminoácidos.	110
3.3.1. Expresión de proteínas fusionadas a la proteína GFP.	110
3.3.2. Actividad de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados.	114
3.4. Fenotipo de crecimiento y liberación de aminoácidos de los mutantes de los transportadores.	116
3.4.1. Crecimiento de los mutantes de sistemas de transporte de aminoácidos.	116
3.4.2. Liberación de aminoácidos al medio extracelular.	118
3.5. Papel de la alanina en el metabolismo diazotrófico.	121
3.5.1. Liberación de alanina dependiente de fijación de N ₂ .	122
3.5.2. Asimilación de alanina.	123
3.5.3. Inactivación y fenotipo de un mutante de la alanina deshidrogenasa.	123
3.6. Otros sistemas de transporte estudiados.	128
3.6.1. Caracterización de la ORF <i>allo342</i> .	128
3.6.2. Sistema de transporte de ácidos carboxílicos.	132
3.6.3. Sistema de transporte N-III.	144
3.6.4. Transporte de aminoácidos en condiciones diazotróficas.	151
4. DISCUSIÓN.	157
4.1. Transporte de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	157
4.2. Implicación de las permeasas de aminoácidos en la transferencia intercelular de nitrógeno.	167

5. CONCLUSIONES.	175
------------------	-----

6. BIBLIOGRAFÍA.	179
------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1. Representación esquemática de tres sistemas de transporte activo típicos.	4
Figura 1.2. Estructura de la porina OmpF de <i>E. coli</i> .	5
Figura 1.3. Representación esquemática de los tipos de sistemas de transporte secundario.	7
Figura 1.4. Estructura de la permeasa LacY de <i>E. coli</i> .	7
Figura 1.5. Estructura general de los sistemas de transporte de tipo ABC.	9
Figura 1.6. Estructura general de las proteínas de unión de ATP y localización de los motivos implicados en su funcionamiento.	10
Figura 1.7. Cambios de conformación en un dímero de ATPasas durante un ciclo de hidrólisis de ATP.	11
Figura 1.8. Cambios de conformación en las subunidades transmembrana del transportador de maltosa MBP-MalFGK ₂ de <i>E. coli</i> .	12
Figura 1.9. Estructura de la proteína periplásmica MBP del sistema de transporte de maltosa MBP-MalFGK ₂ de <i>E. coli</i> .	13
Figura 1.10. Modelo del mecanismo de transporte de los transportadores ABC.	15
Figura 1.11. Diversidad morfológica y diferenciación celular en las cianobacterias.	23
Figura 1.12. Relaciones filogenéticas entre las cianobacterias.	24
Figura 1.13. <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120. Fotografía tomada mediante microscopía óptica de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 cultivada en condiciones diazotróficas.	25
Figura 1.14. Vías principales de asimilación de nitrógeno en cianobacterias.	26
Figura 1.15. Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa de molibdeno.	30
Figura 1.16. Estructura de los heterocistos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	36
Figura 1.17. Ensamblaje de un hexámero de la alanina deshidrogenasa de <i>Phormidium lapideum</i> .	45
Figura 2.1. Vectores comerciales pGEM-T, pGEM-T Easy y pMBL-T de clonación de fragmentos de PCR y plásmidos pCSV3 y pRL424 utilizados para generar mutantes por recombinación simple.	64
Figura 3.1. Disposición del agrupamiento génico <i>natCA</i> y del gen <i>natB</i> en el cromosoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y localización de las mutaciones introducidas en los genes <i>natA</i> , <i>natC</i> y <i>natB</i> .	72
Figura 3.2. Predicción de la topología de la proteína NatC de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	73
Figura 3.3. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6.	74
Figura 3.4. Disposición de la ORF <i>all1284</i> en el cromosoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	75
Figura 3.5. Predicción de la topología del producto de la ORF <i>all1284</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	75
Figura 3.6. Disposición de las ORFs <i>all2912</i> y <i>all2911</i> en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	76
Figura 3.7. Predicción de la topología del producto de la ORF <i>all2911</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	76
Figura 3.8. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR44 para la inactivación de <i>all1284</i> .	77

Figura 3.9. Estructura cromosómica de la estirpe CSR11 en la región <i>all1284</i> .	78
Figura 3.10. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR15 y pCSR24 para la inactivación de <i>all2912</i> y <i>all2911</i> , respectivamente.	79
Figura 3.11. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes CSR5 y CSR4 en la región de las ORFs <i>all2912</i> y <i>all2911</i> , respectivamente.	80
Figura 3.12. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR11, CSR5 y CSR4.	82
Figura 3.13. Disposición del gen <i>bgtB</i> en el cromosoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de la casete génica introducida en el mismo.	83
Figura 3.14. Predicción de la topología de la proteína BgtB de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	83
Figura 3.15. Disposición de la ORF <i>alr4167</i> en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	84
Figura 3.16. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR43 para la inactivación de <i>alr4167</i> .	85
Figura 3.17. Estructura cromosómica de la estirpe CSR10 en la región <i>alr4167</i> .	86
Figura 3.18. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS8 y CSR10.	87
Figura 3.19. Predicción de la topología de los productos de las ORFs <i>alr4165</i> y <i>alr4166</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	89
Figura 3.20. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR16 y pCSR12 para la inactivación de <i>alr4166</i> .	90
Figura 3.21. Estructura cromosómica de las estirpes CSR8a y CSR8b en la región de la ORF <i>alr4166</i> .	91
Figura 3.22. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR60.	92
Figura 3.23. Estructura cromosómica de la estirpe CSR17 en la región de la ORF <i>alr4164</i> .	93
Figura 3.24. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR17, CSR8a y CSR8b.	94
Figura 3.25. Estructura cromosómica de los mutantes dobles CSS6-R17 y CSX60-R8b en la región del agrupamiento génico <i>alr4164-alr4165-alr4166-bgtA</i> .	96
Figura 3.26. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b.	98
Figura 3.27. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR39.	99
Figura 3.28. Estructura cromosómica del mutante doble CSX60-R10 en la región del gen <i>bgtA</i> .	100
Figura 3.29. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSX60-R10.	101
Figura 3.30. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS6, CSX60, CSR17, CSR8b, CSR8a y CSR10.	105
Figura 3.31. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes dobles CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10.	106

Figura 3.32. Filamento fragmentado de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	107
Figura 3.33. Efecto de la fragmentación de filamentos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en la actividad de transporte de los aminoácidos Glu, Gln, Asp y Arg.	108
Figura 3.34. Efecto de la fragmentación de filamentos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en la cinética de transporte de Glu.	109
Figura 3.35. Efecto de la fragmentación de filamentos de las estirpes PCC 7120, CSX60, CSR8b y CSX60-R8b en la actividad de transporte de Glu.	110
Figura 3.36. Esquema de la construcción de un plásmido que contiene el gen <i>bgtA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 fusionado traduccionalmente con el gen testigo <i>gfp</i> .	111
Figura 3.37. Estructura cromosómica de la estirpe mutante CSR21b en la región del agrupamiento génico <i>natFGH-bgtA</i> .	112
Figura 3.38. Localización de la proteína BgtA-C-GFP en la estirpe CSR21b.	113
Figura 3.39. Estructura cromosómica de las estirpes mutantes CSR22b y CSR23b en la región del agrupamiento génico <i>natFGH-bgtA</i> .	114
Figura 3.40. Localización de la proteína BgtA-C-GFP en las estirpes CSR22b y CSR23b.	114
Figura 3.41. Crecimiento de los mutantes <i>nat</i> y CSR4 en medio sólido.	116
Figura 3.42. Acumulación de aminoácidos en el medio extracelular de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10.	119
Figura 3.43. Crecimiento de las estirpes PCC 7120, CSX60, CSS6, CSX62, CSR11, CSR5, CSR4 y 216 en medios sin nitrógeno combinado sin suplementar o suplementado con Ala a concentración 1 mM.	123
Figura 3.44. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR88 para la inactivación de <i>alr2355</i> .	124
Figura 3.45. Estructura cromosómica de los mutantes CSR24 y CSR25 en la región de la ORF <i>alr2355</i> .	125
Figura 3.46. Catabolismo de Ala en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y el mutante CSR24.	127
Figura 3.47. Crecimiento en medio líquido de las estirpes PCC 7120 y CSR24.	127
Figura 3.48. Ensayo de crecimiento de las estirpes PCC 7120, CSR24, 216 y CSR25 en medios sin o con 1 mM de Ala.	128
Figura 3.49. Predicción de la topología de la proteína AlI0342 de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	129
Figura 3.50. Representación esquemática de la construcción del plásmidos pCSR13.	130
Figura 3.51. Estructura cromosómica de la estirpe CSR1 en la región de la ORF <i>alI0342</i> .	131
Figura 3.52. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSR1.	132
Figura 3.53. Disposición de las ORFs <i>alr3026</i> , <i>alr3027</i> y <i>alI3028</i> en el cromosoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	133
Figura 3.54. Predicción de la topología de los productos de las ORFs <i>alr3026</i> y <i>alr3027</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	134

Figura 3.55. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR18 y pCSR11 para la inactivación de <i>alr3027</i> .	135
Figura 3.56. Estructura cromosómica de la estirpe CSR7a en la región de la ORF <i>alr3027</i> .	136
Figura 3.57. Estructura cromosómica de la estirpe CSR7b en la región <i>alr3027</i> .	137
Figura 3.58. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR56 para la inactivación de <i>all3028</i> .	138
Figura 3.59. Estructura cromosómica de la estirpe CSR13a en la región de la ORF <i>all3028</i> .	139
Figura 3.60. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR7b.	140
Figura 3.61. Cinética de transporte de piruvato en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	141
Figura 3.62. Representación esquemática de la actividad de transporte de piruvato de la estirpe mutante CSR7b en medio con nitrato.	142
Figura 3.63. Cinética de transporte de piruvato en las estirpes PCC 7120, CSR7a y CSR13a.	143
Figura 3.64. Actividad de transporte de piruvato en presencia de competidores en las estirpes PCC 7120, CSR7b y CSR13a.	144
Figura 3.65. Disposición de las ORFs <i>alr2535</i> , <i>alr2536</i> , <i>alr2537</i> , <i>alr2538</i> , <i>alr2539</i> , <i>asl2540</i> y <i>alr2541</i> en el cromosoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	144
Figura 3.66. Predicción de la topología de los productos de las ORFs <i>alr2536</i> y <i>alr2538</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	146
Figura 3.67. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR17 para la inactivación de <i>alr2536</i> .	147
Figura 3.68. Estructura cromosómica de la estirpe CSR6 en la región de la ORF <i>alr2536</i> .	148
Figura 3.69. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSR6.	149
Figura 3.70. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados de la estirpe CSR6.	150
Figura 4.1. Sistemas de transporte de aminoácidos N-I, N-II y Bgt.	157
Figura 4.2. Síntesis de ATP en las cianobacterias.	161
Figura 4.3. Vías de entrada de los 20 aminoácidos proteicos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	161
Figura 4.4. Representación esquemática de la actividad de transporte de aminoácidos de mutantes de los sistemas N-I, N-II o Bgt que presentan actividades de transporte más elevadas que la estirpe silvestre para algunos aminoácidos.	162
Figura 4.5. Representación esquemática de las posibles interacciones entre elementos de los sistemas N-I, N-II y Bgt.	163
Figura 4.6. Liberación de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y algunos mutantes de transporte de aminoácidos.	168
Figura 4.7. Importancia de los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt en el crecimiento diazotrófico de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	169

- Figura 4.8.** Correlación de las actividades de transporte de Ala y Gln con el crecimiento diazotrófico en mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 afectados en sistemas de transporte de aminoácidos. 170
- Figura 4.9.** Correlación de la cantidad de Ala liberada al medio con la capacidad de crecimiento diazotrófico en mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 afectados en sistemas de transporte de aminoácidos. 170
- Figura 4.10.** Modelo periplásmico de la transferencia de nitrógeno en el filamento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120. 171

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1. Sistema TC de clasificación de los sistemas de transporte.	4
Tabla 1.2. Superfamilias y familias de proteínas canal y transportadores de aminoácidos y derivados de aminoácidos de bacterias, arqueas y eucariotas.	16
Tabla 2.1. Estirpes mutantes derivadas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo.	49
Tabla 2.2. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	51
Tabla 2.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.	57
Tabla 2.4. Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo.	62
Tabla 2.5. Desoxiloligonucleótidos utilizados en este trabajo.	62
Tabla 3.1. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6.	74
Tabla 3.2. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR13, CSR5 y CSR4.	81
Tabla 3.3. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS8 y CSR10.	87
Tabla 3.4. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR17, CSR8a y CSR8b.	94
Tabla 3.5. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSS6-R17 y CSX60-R8b.	97
Tabla 3.6. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe CSX60-R10.	101
Tabla 3.7. Actividades de transporte de Arg y Lys en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSX60-R8b.	102
Tabla 3.8. Actividades de transporte de Phe y Pro en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSR8b.	103
Tabla 3.9. Actividades de transporte de Asp y Gln en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSX60.	104
Tabla 3.10. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe PCC 7120 y los mutantes CSS6, CSX60, CSR17, CSR8a, CSR8b y CSR10.	105
Tabla 3.11. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe PCC 7120 y los mutantes dobles CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10.	106
Tabla 3.12. Actividades de transporte de aminoácidos en filamentos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 sin fragmentar y fragmentados mecánicamente.	108
Tabla 3.13. Actividades de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de los mutantes CSS8, CSR10 y CSR8b.	115
Tabla 3.14. Crecimiento en medio líquido de los mutantes de sistemas de transporte de aminoácidos.	117
Tabla 3.15. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 24 h.	120
Tabla 3.16. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 48 h.	121

Tabla 3.17. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60 y CSS18 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 48 h.	122
Tabla 3.18. Ensayo de la actividad alanina deshidrogenasa en extractos crudos de las estirpes PCC 7120 y CSR24.	126
Tabla 3.19. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR1.	132
Tabla 3.20. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR7b.	140
Tabla 3.21. Actividad de transporte de piruvato de la estirpe mutante CSR7b.	141
Tabla 3.22. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR6.	149
Tabla 3.23. Actividad de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados del mutante CSR6.	150
Tabla 3.24. Actividad de transporte de aminoácidos en la estirpe silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y los mutantes CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivados en medio BG11 e incubados o no en medio BG11, durante 24 h.	151
Tabla 3.25. Actividad de transporte de aminoácidos en la estirpe silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y la estirpe mutante CSX60-R10 incubadas con aire:CO ₂ .	152
Tabla 4.1. Sistemas de transporte de aminoácidos identificados en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	158
Tabla 4.2. Sistemas de transporte reconocidos de la familia HAAT.	159
Tabla 4.3. Sistemas de transporte reconocidos de la familia PAAT.	160
Tabla 4.4. Otras actividades o permeasas de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	165

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
Ap ^R	Resistencia a Ap
APS	Persulfato amónico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	Trifosfato de adenosina
b	Nucleótido (base nitrogenada)
Bis-acrilamida	N,N'-metilen-bis-acrilamida
BSA	Seroalbúmina bovina
Ci	Curlos
Chl	Clorofila α
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
Cm	Cloramfenicol
Con	Constitutiva (expresión génica)
cpm	Cuentas por minuto
CRP	Proteína receptora de AMP cíclico (del Inglés <i>cAMP Receptor Protein</i>)
Da	Dalton
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
ddNTP	Mezcla de los didesoxirribonucleósidos trifosfato ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP
DEPC	Dietyl pirocarbonato
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Mezcla de los desoxirribonucleósidos trifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
E	Einstein (mol de fotones)
ϵ	Coefficiente de extinción molar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
Em	Eritromicina
Em ^R	Resistencia a Em

<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
G6P	Glucosa-6-fosfato
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N ¹ -2-etanosulfónico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase (mil bases nitrogenadas)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
Km ^R	Resistencia a Km
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
μ	Constante específica de crecimiento
Mb	Megabase (un millón de bases nitrogenadas)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nm	Neomicina
Nm ^R	Resistencia a Nm
2-OB	2-oxobutirato
2-OIC	2-oxoisocaproato
2-OIV	2-oxoisovalerato
2-OMV	2-oxo-3-metilvalerato
2-OG	2-oxoglutarato
2-OV	2-oxovalerato
ORF	Pauta de lectura abierta (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
P _x	Promotor de gen <i>x</i>
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de nucleótidos (bases nitrogenadas)
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur (del inglés <i>Pasteur Culture Collection</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Poli(etil)englicol
PEP	Fosfoenolpiruvato

6PG	6-Fosfogluconato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pyr	Piruvato
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sm	Estreptomicina
Sm ^R	Resistencia a Sm
Sp	Espectinomicina
Sp ^R	Resistencia a Sp
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TLC	Cromatografía en capa fina
Tricina	N-tris-(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-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
	Orn	Ornitina
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. Transporte de membrana y sistemas de transporte.

1.1.1. Transporte a través de membranas.

El transporte de sustancias a través de membranas es un aspecto esencial de los procesos que se llevan a cabo en los organismos vivos. Por una parte, permite la entrada a la célula de nutrientes esenciales y mantiene concentraciones fisiológicas de iones en el interior celular que pueden diferir en órdenes de magnitud de las presentes en el medio externo. Por otra parte, regula la concentración de metabolitos en el citoplasma mediante mecanismos de excreción y evita los efectos nocivos de toxinas y drogas mediante su exportación activa. Por último, exporta macromoléculas, cataliza la importación y exportación de moléculas de señalización que median la comunicación de la célula con el medio externo, así como la comunicación intercelular, y participa en procesos de defensa y ataque mediante la exportación de agentes biológicos activos que atraviesan las membranas de las células diana.

En las bacterias Gram-negativas, para entrar en la célula, los sustratos deben superar en primer lugar la barrera de permeabilidad que supone la membrana externa y, una vez en el espacio periplásmico, atravesar la membrana plasmática. La membrana externa es muy impermeable a compuestos tóxicos como antibióticos, toxinas y enzimas líticas, siendo una de sus principales funciones la protección de la célula frente a este tipo de compuestos. Esta membrana presenta una estructura asimétrica, al estar constituida por una monocapa externa rica en lipopolisacáridos y otra interna de fosfolípidos. Esta asimetría y algunas características de los lipopolisacáridos, como la presencia de 6 ó 7 cadenas de ácidos grasos saturados por molécula en lugar de las 2 presentes por molécula de fosfolípido, explican las propiedades de impermeabilidad de esta envuelta (Nikaido, 2003). Sin embargo, en la membrana externa existen canales proteicos hidrofílicos, conocidos como porinas, que permiten la difusión, generalmente inespecífica o con baja especificidad, de moléculas pequeñas. En aquellas bacterias que carecen prácticamente de porinas inespecíficas, la presencia de porinas específicas tiene una gran importancia en los procesos de transporte. Además de las porinas, en la membrana externa también hay canales con sitios de unión específicos que facilitan la difusión de determinados compuestos que son demasiado grandes para penetrar rápidamente a través de los canales de las porinas clásicas (Nikaido, 2003). Una vez superada la membrana externa y el espacio periplásmico, la estructura que rodea a la célula es la membrana plasmática, que representa la barrera principal de las células para la difusión de solutos. Esta membrana presenta un elevado número de sistemas de transporte específicos para distintos sustratos, destacando en bacterias por su importancia fisiológica los sistemas de transporte activo secundario y los primarios de tipo ABC (del inglés *ATP-binding Cassette superfamily*) (Figura 1.1).

De forma general, mientras que el transporte pasivo ocurre a favor del gradiente electroquímico del sustrato hasta que se alcanza el equilibrio, como en el caso del mediado por las porinas de la membrana externa, el transporte activo requiere un aporte de energía, como ocurre en el caso de los sistemas de transporte activo primario y secundario de la membrana plasmática, y permite la concentración de los sustratos en contra de su gradiente electroquímico.

1.1.2. Clasificación de los sistemas de transporte.

Los sistemas de transporte de todos los organismos vivos de la Tierra se han clasificado, siguiendo criterios funcionales y filogenéticos, en varias clases que, a su vez, se han dividido en varias familias, constituyendo el denominado sistema TC (del inglés *Transporter Classification system*) (Busch y Saier,

2002, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). La estructura de dicha clasificación, que se resume en la Tabla 1.1, es la siguiente:

- Clase 1.** Canales o poros. Median procesos de difusión en los que el sustrato atraviesa la membrana a través de un poro o canal sin que haya asociado un gasto de energía. Esta clase comprende las siguientes subclases: A, canales proteicos tipo hélice α ; B, porinas formadas por barriles β ; C, canales de toxinas; D, canales sintetizados extrarribosómicamente; E, holinas, canales implicados en la lisis celular producida por los bacteriófagos, al permitir la exportación de hidrolasas de mureína que degradan la pared celular, y en la muerte celular, al facilitar la pérdida de electrolitos y nutrientes del citoplasma celular, caso en que se denominan autolisinas; F, poros de fusión de vesículas, implicados en iniciar la fusión de vesículas con la membrana plasmática en procesos de exocitosis en eucariotas; G, poros de fusión virales, necesarios para permitir la entrada de virus con envuelta en células eucariotas y H, canales paracelulares, encargados de la reabsorción intercelular de iones, drogas y nutrientes en epitelios. En esta clase se encuentran las porinas OmpF de *Escherichia coli* (familia OOP, del inglés *OmpA-OmpF Porin family*; TC 1.B.6) (Nikaido, 2003) o SomA de *Synechococcus* sp. PCC 6301 (familia CBP, del inglés *Cyanobacterial Porin family*; TC 1.B.23) (Hansel *et al.*, 1998), que permiten el paso de iones y moléculas pequeñas.
- Clase 2.** Portadores secundarios. Estos sistemas de transporte median el transporte por difusión facilitada o mediante un transporte activo en contra del gradiente electroquímico del sustrato transportado. Sin embargo, a diferencia de las proteínas de la clase anterior, los sistemas de transporte secundario presentan un canal de translocación que no se expone a ambos lados de la membrana plasmática simultáneamente, siendo necesario para el funcionamiento de este tipo de permeasas un cambio de conformación que permita exponer el canal a cada lado alternativamente. Generalmente son estereoespecíficos y están acoplados a una fuerza protón-motriz (*pmf*, del inglés *Proton Motive Force*), sodio-motriz (*smf*, del inglés *Sodium Motive Force*) o al potencial de membrana en el caso de algunos sustratos cargados, de forma que la energía utilizada para el transporte no se genera en el propio transportador. Esta clase está constituida por las siguientes subclases: A, portadores energizados por un gradiente quimiosmótico (uniportadores, simportadores o antiportadores); B, portadores sintetizados extrarribosómicamente y C, otros sistemas energizados por un gradiente de iones, como es el caso del flagelo bacteriano. En esta clase destaca la superfamilia MFS (del inglés *Major Facilitator Superfamily*; TC 2.A.1), que abarca un amplísimo número de transportadores, entre los que se encuentra la permeasa LacY de *E. coli* que cataliza un cotransporte de lactosa y H^+ (Maloney y Wilson, 1996; Abramson *et al.*, 2003a; Abramson *et al.*, 2003b). A esta clase también pertenece la familia TRAP-T (del inglés *Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter family*; TC 2.A.56), que se describirá más adelante.
- Clase 3.** Transportadores primarios. Median el transporte activo, normalmente en contra de gradiente electroquímico, utilizando energía generada en el propio transportador. Las subclases que se engloban en esta clase son: A, sistemas acoplados a hidrólisis de enlaces fosfato; B, sistemas acoplados a procesos de descarboxilación; C, sistemas acoplados a transferencia de grupos metilo; D, sistemas acoplados a procesos redox y E, sistemas acoplados a la absorción de energía lumínica. En esta clase destacan los miembros de la superfamilia ABC (TC 3.A.1), que utilizan ATP como fuente de energía y llevan a cabo funciones fisiológicas muy importantes para las células, pudiendo mediar tanto procesos de importación como de exportación.

- Clase 4. Translocadores de grupo. Son sistemas que alteran químicamente el sustrato durante su transporte, de forma que la sustancia que se libera en el citoplasma es diferente de la que se encuentra en el medio extracelular. En esta clase encontramos las siguientes subclases: A, translocadores dependientes de fosfoenolpiruvato (PEP) que median la transferencia de grupos fosfato a azúcares; B, translocadores dependientes de ATP que median la transferencia de grupos fosfato a ribonucleósidos de nicotinamida, generando mononucleótidos de nicotinamida (NMN), y C, translocadores dependientes de ATP que median la tioesterificación de ácidos grasos con coenzima A. En esta clase destaca el sistema de transporte de carbohidratos PTS (del inglés *Phosphotransferase System*; TC 4.A), que basa su actividad en la fosforilación dependiente de PEP de una molécula de azúcar durante su transporte a través de la membrana plasmática.
- Clase 5. Proteínas transmembrana transportadoras de electrones. Esta clase incluye sistemas que dirigen el flujo de electrones a través de membranas biológicas, distinguiéndose en ella dos subclases: A, transportadores que transfieren 2 electrones y B, transportadores que median la transferencia de 1 electrón. En esta clase se encuentra, por ejemplo, el fotosistema I (PSI), perteneciente a la familia PSI (del inglés *Plant Photosystem I Supercomplex family*; TC 5.B.4).
- Clase 8. Factores accesorios implicados en procesos de transporte. Incluye proteínas que funcionan con proteínas de transporte o bien están físicamente asociadas a ellas. En algunos casos, estas proteínas auxiliares se consideran como una parte integral de los sistemas de transporte, ya que facilitan el transporte a través de una o más membranas biológicas, aunque no participan directamente en el proceso. Esta clase reúne tres subclases: A, proteínas de transporte auxiliares; B, toxinas peptídicas sintetizadas ribosómicamente que interactúan con canales y transportadores y C, toxinas sintetizadas extrarribosómicamente que interactúan con canales y transportadores. A esta clase pertenece la familia MFP (del inglés *Membrane Fusion Protein family*; TC 8.A.1), que incluye proteínas auxiliares que funcionan en bacterias Gram-negativas como adaptadores, conectando transportadores de la membrana plasmática, como los de las superfamilias MFS y ABC, con porinas de la membrana externa pertenecientes a la familia OMF (del inglés *Outer Membrane Factor family*; TC 1.B.17) (Touzé *et al.*, 2004).
- Clase 9. Sistemas de transporte cuya caracterización no está completa. Incluye familias de proteínas de transporte de las que se tiene una información incompleta: A, transportadores reconocidos pero con mecanismo bioquímico desconocido; B, posibles proteínas de transporte no caracterizadas; C, transportadores caracterizados funcionalmente pero de secuencia desconocida.

El sistema TC de clasificación de los transportadores es análogo al sistema funcional EC de clasificación de las enzimas, pero difiere de éste al contemplar, además de aspectos funcionales, aspectos filogenéticos. En este sistema de clasificación, las familias específicas de bacterias superan en número a las específicas de eucariotas en una proporción aproximada de 2 a 1, mientras que el número de las familias con miembros distribuidos entre los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* corresponde aproximadamente a la mitad del de las familias específicas de eucariotas (Busch y Saier, 2002, 2004). Estos datos sugieren que durante los últimos 2.000 millones de años (Ma) no se haya producido de forma significativa una transferencia horizontal de genes que determinan sistemas de transporte entre los tres dominios de la vida (Busch y Saier, 2002, 2004).

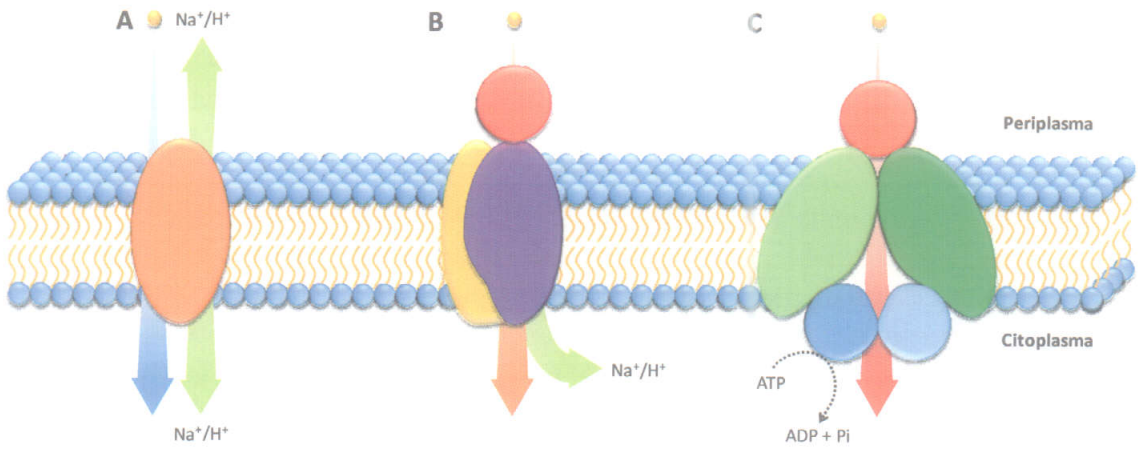


Figura 1.1. Representación esquemática de tres sistemas de transporte activo típicos. A, permeasa de transporte secundario energizada por el cotransporte o intercambio de iones Na^+ o H^+ . B, transportador secundario de tipo TRAP-T, energizado por el cotransporte de iones Na^+ o H^+ y constituido por dos subunidades transmembrana de distinto tamaño (en violeta y amarillo) y una periplásmica de unión de sustrato (en rojo). C, sistema de transporte primario de tipo ABC de bacterias energizado por la hidrólisis de ATP. Los sistemas ABC están constituidos por, al menos, dos subunidades transmembrana (en verde) y dos ATPasas (en azul), y son dependientes de una proteína periplásmica de unión de sustrato (en rojo). Los sustratos se representan como esferas amarillas.

Tabla 1.1. Sistema TC de clasificación de los sistemas de transporte. La clasificación está basada en el sistema TC de Busch y Saier (2002, 2004). Información ampliada en Saier *et al.* (2006), Saier *et al.* (2009) y <http://www.tcdb.org>. Se indica la clase y subclase a la que pertenece cada grupo de transportadores (TC).

Nombre de la superfamilia o familia	TC
Canales o poros	
Canales proteicos tipo hélice α	1.A
Porinas formadas por barriles β	1.B
Canales de toxinas	1.C
Canales sintetizados extrarribosómicamente	1.D
Holinas	1.E
Poros de fusión de vesículas	1.F
Poros de fusión virales	1.G
Canales paracelulares	1.H
Transportadores energizados por potencial electroquímico	
Portadores energizados por un gradiente quimiosmótico	2.A
Portadores sintetizados extrarribosómicamente	2.B
Sistemas energizados por un gradiente de iones	2.C
Transportadores primarios	
Sistemas acoplados a hidrólisis de enlaces fosfato	3.A
Sistemas acoplados a procesos de descarboxilación	3.B
Sistemas acoplados a transferencia de grupos metilo	3.C
Sistemas acoplados a procesos rédox	3.D
sistemas acoplados a absorción de energía lumínica	3.E
Translocadores de grupo	
Translocadores dependientes de PEP que transfieren grupos fosfato a azúcares	4.A
Translocadores dependientes de ATP que transfieren grupos fosfato a ribonucleósidos de nicotinamida	4.B
Translocadores dependientes de ATP que median la tioesterificación de ácidos grasos con coenzima A	4.C
Proteínas transmembrana transportadoras de electrones	
Transportadores que transfieren 2 electrones	5.A
Transportadores que transfieren 1 electrón	5.B
Factores accesorios implicados en procesos de transporte	
Proteínas de transporte auxiliares	8.A
Toxinas peptídicas sintetizadas ribosómicamente que interaccionan con canales y transportadores	8.B
Toxinas sintetizadas extrarribosómicamente que interaccionan con canales y transportadores	8.C
Sistemas de transporte cuya caracterización no está completa	
Transportadores reconocidos pero con mecanismo bioquímico desconocido	9.A
Posibles proteínas de transporte no caracterizadas	9.B
Transportadores caracterizados funcionalmente pero de secuencia desconocida	9.C

A continuación, se describen en detalle algunos tipos de sistemas de transporte de especial interés en este trabajo, como las proteínas canal (subclases TC 1.A y 1.B), los sistemas de transporte secundario (subclase TC 2.A) y los sistemas de transporte primario de tipo ABC (superfamilia TC 3.A.1).

1.1.3. Canales o poros.

Las proteínas de esta categoría forman canales transmembrana que consisten en gran parte en regiones en hélice α o lámina β . Los sistemas de transporte de este tipo generalmente permiten la difusión o translocación de solutos, en un proceso independiente de energía, mediante el paso a través de un poro transmembrana o canal. Los canales no presentan estereoespecificidad pero pueden ser específicos para una especie molecular particular o una clase de moléculas (Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>).

En este grupo de proteínas destacan las subclases de los canales proteicos tipo hélice α (TC 1.A) y de las porinas formadas por barriles β (TC 1.B). Las primeras están ampliamente distribuidas en las membranas plasmáticas de todos los tipos de organismos, desde bacterias hasta eucariotas superiores, y consisten principalmente en hélices α transmembrana, aunque también pueden estar presentes láminas β que pueden formar parte del canal. La mayoría de los canales proteicos tipo hélice α presentan 1 ó 2 segmentos transmembrana hidrofóbicos en hélice α por cadena polipeptídica, aunque también pueden presentar entre 3 y 6 segmentos, o incluso hasta 24 en algunos casos (Busch y Saier, 2002; Saier, 2003). Los canales de este tipo son proteínas que forman homo o heterooligómeros a partir de pequeños dominios integrales de membrana (Saier, 2003), por lo que podrían haber servido como sillares para la construcción de canales más grandes y complicados y de proteínas de transporte de tipo portador (Saier, 2000a).

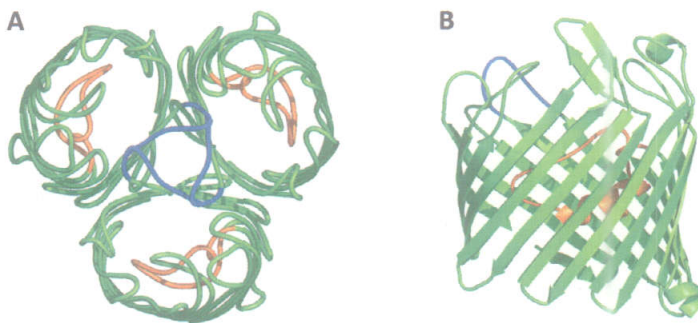


Figura 1.2. Estructura de la porina OmpF de *E. coli*. A, vista superior del trímero de subunidades que constituye la porina OmpF. El lazo 2, de color azul, es necesario para la interacción de cada monómero con la subunidad vecina, mientras que el lazo 3, de color naranja, delimita el canal. B, vista lateral de un monómero. Los lazos 2 y 3 se muestran en el mismo color que en el panel A. Figura adaptada de Nikaido (2003).

Por otra parte, las proteínas tipo porina también forman poros transmembrana, pero las regiones transmembrana de las mismas consisten exclusivamente en láminas β que forman un barril β . Las porinas son proteínas monoméricas o triméricas en las que cada subunidad presenta una estructura de barril β , con 16 hojas β antiparalelas plegadas que atraviesan la membrana formando un canal (Nikaido, 2003), como la porina OmpF de *E. coli* (Figura 1.2). En algunas bacterias, como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, también se han descrito porinas triméricas que presentan además un sitio de unión específico para determinados sustratos, como las porinas OprB (llamada anteriormente OprD1), específica de glucosa (Nikaido y Vaara, 1985; Trias *et al.*, 1988), y OprD (llamada anteriormente OprD2), específica de aminoácidos básicos, de *P. aeruginosa* (Trias y Nikaido, 1990). Las porinas se localizan en las membranas externas de bacterias Gram-negativas, mitocondrias, plástidos y, posiblemente también,

en la membrana plasmática de algunas bacterias Gram-positivas, como las del género *Mycobacteria* (Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>).

La subclase de canales proteicos tipo hélice α (TC 1.A) reúne una gran variedad de familias diferentes, de las cuales destacan la superfamilia VIC (del inglés *Voltage-gated Ion Channel superfamily*; TC 1.A.1), que incluye proteínas canal selectivas de iones que se encuentran en bacterias, arqueas, eucariotas y virus; la familia MIP (del inglés *Major Intrinsic Protein family*; TC 1.A.8), que engloba miembros capaces de transportar agua, pequeños carbohidratos como glicerol, urea, CO_2 , H_2O_2 e iones, y en la cual destaca el canal de glicerol GlpF de *E. coli* (Weissenborn *et al.*, 1992), y la familia Amt (del inglés *Ammonia Channel Transporter family*; TC 1.A.11, anteriormente TC 2.A.49), que reúne canales proteicos que transportan NH_3 o NH_4^+ y que, en algunas bacterias, parecen regular el metabolismo del nitrógeno por interacción directa con proteínas reguladoras como la proteína P_{II} (Coutts *et al.*, 2002).

Los sistemas de transporte Amt constituyen una familia de proteínas de distribución universal entre los seres vivos. Estas proteínas, cuya función conocida es el transporte de amonio a través de las membranas biológicas, pueden transportar también metilamonio y se han descrito en plantas superiores como AMT, en bacterias como Amt y en hongos como MEP (Marini *et al.*, 1994; Ninnemann *et al.*, 1994; Siewe *et al.*, 1996; Montesinos *et al.*, 1998; Rawat *et al.*, 1999). Por ello se conoce a su conjunto como familia AMT/MEP (del Inglés *Ammonium Transporters/Methylammonium Permeases*). Las proteínas Amt presentan 11 dominios transmembrana en hélice α , con el extremo amino terminal en el espacio periplásmico de la célula y el extremo carboxilo terminal en el citoplasma, pero algunas proteínas de la familia pueden tener adicionalmente otro dominio transmembrana en la región amino terminal, en cuyo caso los dominios carboxilo terminal y amino terminal se sitúan los dos en el interior de la célula (Thomas *et al.*, 2000). La longitud del dominio carboxilo terminal es variable entre las distintas proteínas Amt investigadas, pero estudios recientes realizados en *Arabidopsis thaliana* y *E. coli* han definido una región de 22 residuos con un papel importante para el funcionamiento de la proteína, con un alto grado de conservación en todas las proteínas de la familia (Neuhauser *et al.*, 2007; Severi *et al.*, 2007). Esta proteínas, cuya estructura cristalográfica se ha resuelto recientemente (Khademi *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004), pueden estar constituidas tanto por heterotrimeros como por homotrimeros (Marini *et al.*, 2000; Ludewig *et al.*, 2003), presentando cada subunidad un canal hidrofóbico a través del cual sólo podría pasar el amoniaco. De este modo, estas proteínas unirían inicialmente amonio, que sería desprotonado para dar lugar a amoniaco, que sería la especie transportada (Javelle *et al.*, 2005). Además, en algunos organismos el transporte de amoniaco podría estar acoplado al transporte de protones, lo que cuestionaría la pertenencia de las proteínas Amt a la Clase 1 (Ludewig, 2006).

1.1.4. Sistemas de transporte secundario.

La subclase 2.A, que reúne los sistemas de transporte secundario, también conocidos como portadores, está constituida por proteínas que presentan al menos 4 segmentos transmembrana en hélice α , aunque lo más frecuente es la presencia de 8-14 hélices α hidrofóbicas (Saier, 2003; Jung *et al.*, 2006). En muchos casos, estos transportadores surgieron a partir de un evento de duplicación génica en el que un gen ancestral que determinaba una proteína con 4, 5 ó 6 dominios transmembrana en hélice α se duplicó para dar lugar a una proteína con 8, 10 ó 12 hélices α , respectivamente (Saier, 2000a, 2003). Otros portadores presentan entre 4 y 7 segmentos transmembrana en hélice α por cadena polipeptídica, siendo el transportador funcional en estos casos un homodímero o un heterodímero (Chung y Saier, 2001; Jack *et al.*, 2001; Kaplan, 2001; Saier, 2003).

Los sistemas secundarios pueden transportar el sustrato por difusión facilitada, utilizando el gradiente de concentración del propio sustrato, o mediante un proceso dependiente del potencial de

membrana si el sustrato está cargado (uniporte en ambos casos; Figura 1.3A). También pueden acoplar el transporte del sustrato al de iones Na^+ , H^+ o, excepcionalmente, K^+ , que pueden moverse a favor de gradiente en el mismo sentido que el sustrato (simporte o cotransporte; Figura 1.3B) o en sentido contrario (antiporte o intercambio; Figura 1.3C), o bien intercambian un sustrato por otro (antiporte o intercambio soluto-soluto; Figura 1.3D) (Marger y Saier, 1993; Saier, 2000c; Busch y Saier, 2002, 2004).

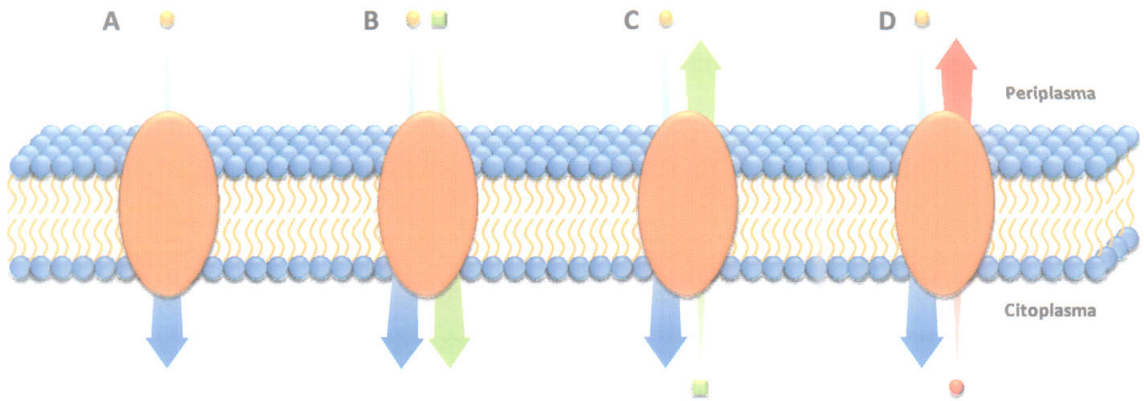


Figura 1.3. Representación esquemática de los tipos de sistemas de transporte secundario. A, uniporte a favor de gradiente electroquímico. B, simporte o cotransporte. C, antiporte o intercambio. D, antiporte o intercambio soluto-soluto. Los sustratos se representan como esferas amarillas o rojas y los iones como cuadrados verdes.

En base al análisis de la secuencia de varios miles de permeasas, en la actualidad se distinguen casi un centenar de transportadores secundarios filogenéticamente diferentes que se han reunido en dos grandes grupos. El mayoritario, que engloba aproximadamente al 80% de las proteínas estudiadas, entre las que se incluyen las de la superfamilia MFS (Figura 1.3), está integrado por proteínas monoméricas con 8-14 hélices α , aunque lo más habitual son 12, e incluye algunas permeasas de bacterias, arqueas y eucariotas (Henderson, 1993; Chang *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2006). Un caso especial en este grupo es el de los sistemas de transporte de la familia TRAP-T, que están constituidos por dos proteínas transmembrana de diferente tamaño y una proteína periplásmica de unión de sustrato (Forward *et al.*, 1997; Rabus *et al.*, 1999) (Figura 1.1B). En el grupo minoritario, compuesto por proteínas localizadas en orgánulos eucarióticos (mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas), los transportadores son dímeros en los que cada monómero presenta entre 4 y 7 hélices α transmembrana (Kuan y Saier, 1993b, a; Saier, 2003; Jung *et al.*, 2006). El portador mejor caracterizado es el de la lactosa de *E. coli* (LacY; Figura 1.4), que media un simporte de lactosa y H^+ y sirve como paradigma de este tipo de sistemas de transporte (Maloney y Wilson, 1996; Abramson *et al.*, 2003a; Abramson *et al.*, 2003b).

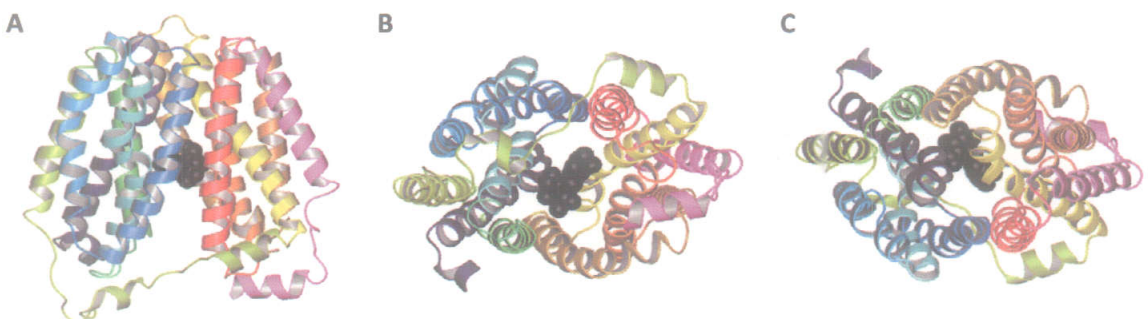


Figura 1.4. Estructura de la permeasa LacY de *E. coli*. La estructura está basada en la proteína con una molécula de TDG (β -D-galactopiranosil-1-tio- β -D-galactopiranosido) unida, que se muestra en negro. A, vista lateral de LacY con el lado intracelular en la parte inferior. B, vista de LacY desde el lado intracelular, mostrando la cavidad que contiene al sustrato. C, vista de LacY desde el lado periplásmico. Figura adaptada de DeFelice (2004).

La superfamilia MFS es una agrupación evolutivamente muy antigua, grande y diversa que reúne más de 10.000 miembros secuenciados (Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). Las permeasas de esta superfamilia funcionan como uniportadores, simportadores soluto:cación (H^+ o Na^+) y/o antiportadores soluto: H^+ o soluto:soluto (Marger y Saier, 1993; Pao *et al.*, 1998; Saier *et al.*, 1999a; Saier, 2000b). La mayoría de ellas poseen bien 12 ó 14 posibles segmentos transmembrana en hélice α o bien 24, apareciendo dos dominios cada uno con 12 segmentos transmembrana en hélice α (Saier, 2000b; Chang *et al.*, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). En general, este último tipo de proteínas de la familia MFS son proteínas de fusión de dos permeasas MFS homólogas pero distintas (Wood *et al.*, 2002). Las permeasas agrupadas en la superfamilia MFS están ampliamente distribuidas en los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, y muestran especificidad por una enorme diversidad de sustratos, como azúcares, aminoácidos, metabolitos del ciclo de Krebs, péptidos, nucleósidos, neurotransmisores, Intermediarios glucolíticos fosforilados, sideróforos, iones orgánicos e inorgánicos y otros tipos de compuestos (Saier, 2000b; Chang *et al.*, 2004). En general, cada una de las familias reconocidas dentro de la superfamilia MFS es específica para una clase de compuestos (Saier, 2000b), y los miembros que median el transporte de azúcares o aminoácidos pueden concentrar sus sustratos en el interior celular hasta 1.000 veces cuando están presentes en el medio externo a concentraciones bajas (Davidson y Maloney, 2007).

Por otra parte, las permeasas de la familia TRAP-T, como se ha indicado, consisten generalmente en heterotrímeros con tres subunidades o dominios no homólogos, que corresponden a dos proteínas de membrana de diferente tamaño, con 12 y 4 segmentos transmembrana en hélice α , y una proteína periplásmica de unión de sustrato (Forward *et al.*, 1997; Rabus *et al.*, 1999; Kelly y Thomas, 2001). Las subunidades transmembrana grandes de los miembros de esta familia presentan homología con los miembros de la superfamilia IT (del inglés *Ion Transporter superfamily*), por lo que la familia TRAP-T se engloba dentro de esta superfamilia (Rabus *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2003). La superfamilia IT reúne a sistemas de transporte específicos de compuestos catiónicos y aniónicos (Prakash *et al.*, 2003). Los miembros de la familia TRAP-T funcionan mediante un simporte de iones Na^+ o H^+ para la incorporación de dicarboxilatos principalmente, aunque también pueden estar implicados en el transporte de otros compuestos estructuralmente divergentes, en su mayoría derivados de carboxilatos (Kelly y Thomas, 2001; Thomas *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2007). El miembro mejor caracterizado de esta familia es el sistema DctMQP de *Rhodobacter capsulatus* (Forward *et al.*, 1997), que se utiliza como prototipo para la misma (Rabus *et al.*, 1999; Kelly y Thomas, 2001). En esta permeasa, DctM constituye la proteína transmembrana grande, DctQ corresponde a la proteína transmembrana pequeña y DctP es la proteína periplásmica de unión de sustrato, siendo las tres necesarias para la importación de dicarboxilatos, lo cual sugiere que funcionan juntas por un mecanismo concertado (Forward *et al.*, 1997; Rabus *et al.*, 1999). Probablemente, todos los sistemas TRAP-T dependen del equivalente estructural de tres proteínas DctMQP (Rabus *et al.*, 1999; Kelly y Thomas, 2001). Del sistema DctMQP de *R. capsulatus* se han identificado homólogos en un amplio número de procariontes, tanto bacterias como arqueas, pero no en eucariotes. En algunas de estas permeasas, entre las que se incluyen todas las de arqueas que se conocen en la actualidad, el homólogo M está fusionado al homólogo Q, generándose una proteína con 16 dominios transmembrana en hélice α . En algunos otros casos, el homólogo Q está fusionado con el homólogo P (Kelly y Thomas, 2001; Mulligan *et al.*, 2007). La familia TRAP-T parece ser antigua, pero funcionalmente unificada, que evolucionó en paralelo con la superfamilia ABC, que también presenta proteínas de unión de sustrato (véase el apartado siguiente), con un escaso o inexistente intercambio de elementos entre las dos familias (Rabus *et al.*, 1999). La familia TRAP-T constituye, pues, la única en la que un receptor extracitoplasmático funciona junto con un portador secundario.

1.1.5. Sistemas de transporte primario de tipo ABC.

Dentro de la subclase 3.A, constituida por los sistemas de transporte acoplados a la hidrólisis de enlaces fosfato, se encuentra la familia 3.A.1, que engloba a los sistemas de transporte de tipo ABC. Éstos importan o excretan solutos que pueden ser iones orgánicos e inorgánicos, aminoácidos, azúcares, grandes polisacáridos, péptidos o incluso proteínas (Higgins, 1992). Los transportadores de tipo ABC son sistemas multicomponente cuya fuente de energía para el proceso de transporte se obtiene de la hidrólisis del ATP (Ames *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1990). En general, estos sistemas muestran una alta afinidad por su sustrato, presentando normalmente valores de K_s mucho menores que los que exhiben los sistemas de transporte secundario. Están constituidos por 4 dominios, dos de unión de ATP (ATPasa) y dos transmembrana (componente de membrana) (Figura 1.5A). En bacterias, los cuatro dominios suelen estar constituidos por polipéptidos diferentes, y en los sistemas de transporte hacia el interior de la célula está presente, además, un dominio de unión de sustrato que se corresponde con la proteína periplásmica de unión de sustrato (Kerr, 2002), motivo por el que estos sistemas también se conocen como sistemas dependientes de proteína periplásmica de unión de sustrato (Figura 1.5B, C). Sin embargo, en el equivalente eucariótico de los importadores de tipo ABC falta el elemento periplásmico. En este grupo también se engloba un gran número de sistemas procarióticos exportadores de diferentes compuestos, en los que no existe proteína periplásmica de unión de sustrato (Figura 1.5A), así como una serie de proteínas de transporte eucarióticas de gran importancia médica, como el sistema de exportación Mdr, responsable de la resistencia múltiple a drogas en tumores humanos.

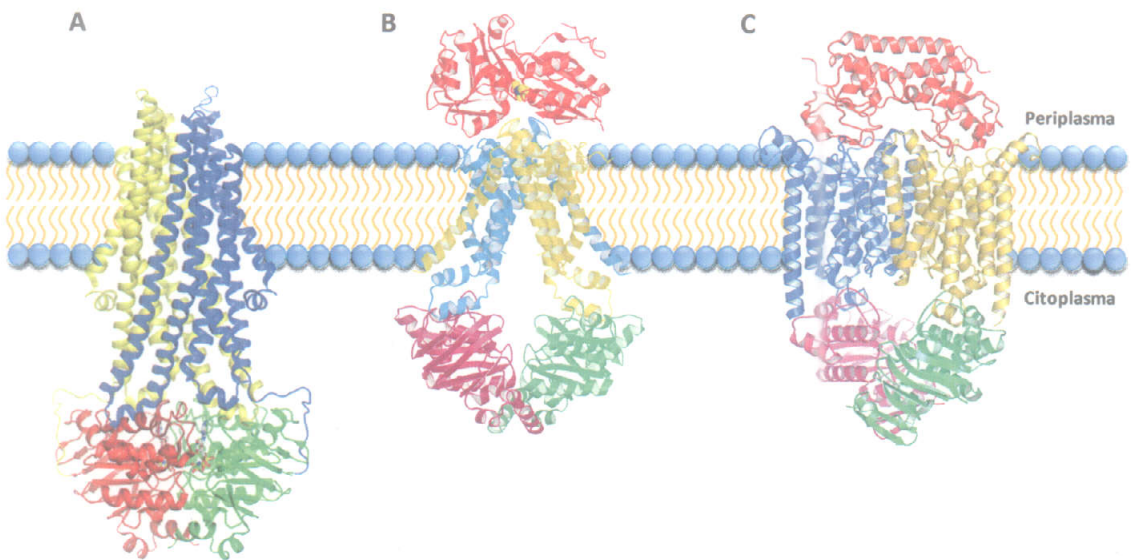


Figura 1.5. Estructura general de los sistemas de transporte de tipo ABC. A, sistema de exportación Sav1866 de *Staphylococcus aureus*, constituido por dos polipéptidos que presentan un dominio transmembrana y otro de unión de ATP cada uno. Los dominios ATPasa se muestran en rojo y verde y los de membrana en amarillo y azul. Figura adaptada de Oldham *et al.* (2008). B, sistema de importación ModB₂C₂A de MoO₄⁻/WO₄⁻ de *Archaeoglobus fulgidus*, constituido por 5 polipéptidos independientes correspondientes a dos subunidades transmembrana (en amarillo y azul), dos ATPasas (en violeta y verde) y una proteína periplásmica de unión de sustrato (en rojo). Figura adaptada de Lee *et al.* (2007). C, sistema BtuC₂D₂F de importación de vitamina B₁₂ en *E. coli*, formado por 5 subunidades independientes que determinan dos proteínas de membrana (en amarillo y azul), dos de unión de ATP (en violeta y verde) y una proteína periplásmica de unión de sustrato (en rojo). Figura adaptada de Hvorup *et al.* (2007). En los tres casos se indican los extremos N-terminal y C-terminal de los polipéptidos que forman los complejos proteicos.

1.1.5.1. Componente conservado de unión de ATP.

Las proteínas de unión de ATP de los sistemas ABC son hidrofílicas y poseen la capacidad de interactuar con los componentes de membrana asociándose a ellos en su lado citoplasmático. Están

muy conservadas entre los distintos sistemas de transporte de la familia ABC, incluso pertenecientes a organismos diferentes, tanto eucarióticos como de bacterias o arqueas, por lo que se las conoce también como el «componente conservado» (Ames *et al.*, 1990). Estas proteínas tienen un motivo muy conservado que recibe los nombres de plegamiento de Rossmann (Rossmann *et al.*, 1975), motivo de Walker (Walker *et al.*, 1982) o motivo de Doolittle (Doolittle *et al.*, 1986). Éste consiste en una región de unos 200 aminoácidos que contiene dos sitios, denominados sitio A y sitio B, que constituyen el dominio de unión de ATP (Figura 1.6) (Rossmann *et al.*, 1975). A esta región se le denomina región ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*) y por ello estas permeasas se conocen con el nombre general de transportadores de tipo ABC (Higgins *et al.*, 1990). Otros motivos característicos presentes en esta región de las ATPasas son el denominado lazo C (Linton y Higgins, 1998), exclusivo de los transportadores de tipo ABC, que también está implicado en la unión de ATP y cuya secuencia es LSGGQ (Fetsch y Davidson, 2002), y el denominado lazo Q, que permite la interacción entre las subunidades transmembrana y las de unión de ATP (Figura 1.6) (Locher *et al.*, 2002).

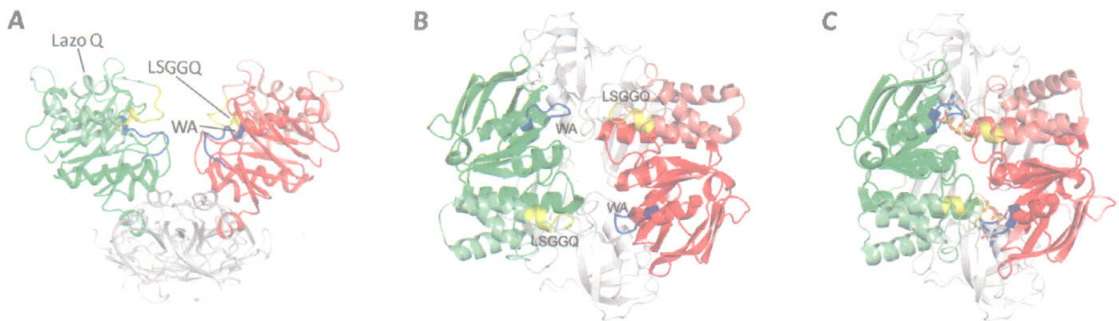


Figura 1.6. Estructura general de las proteínas de unión de ATP y localización de los motivos implicados en su funcionamiento. A, vista lateral de un dímero de MalK, perteneciente al transportador de maltosa de *E. coli*, en el que se muestra el dominio ABC de unión de ATP de cada monómero (verde y rojo), destacando el sitio de Walker_A (azul), el lazo C (amarillo), de secuencia LSGGQ, y el lazo Q, que permite la interacción de las ATPasas con las proteínas de membrana del sistema. B, vista superior del dímero de MalK en ausencia de ATP y, C, en presencia de ATP. Figura adaptada de Khare *et al.* (2009).

Las proteínas de unión de ATP constituyen el elemento energizador, mediante la hidrólisis de ATP, del sistema (Ames *et al.*, 1989; Dean *et al.*, 1989) y se presentan como homo o heterodímeros, según sean determinadas por uno o dos genes, aunque en algunos casos también se han descrito pseudodímeros, cuando se trata de un único polipéptido que presenta dos mitades homólogas entre sí (Higgins, 1992; Saurin y Dassa, 1994; Davidson y Maloney, 2007). Ejemplos de este último caso se encuentran en los sistemas de transporte de arabinosa (Scripture *et al.*, 1987), galactosa (Hogg *et al.*, 1991) y ribosa (Bell *et al.*, 1986) de *E. coli*. Para que se forme el dímero, las proteínas de unión de ATP requieren de la interacción del lazo Q de cada subunidad con las regiones citoplasmáticas de las proteínas de membrana del sistema, formándose una interfase entre las dos ATPasas en la que se disponen los dos dominios de unión de ATP (Davidson y Maloney, 2007). Este dímero es poco estable en ausencia de ATP y da lugar a un complejo abierto que permite la entrada de los nucleótidos a los dominios de unión (Davidson *et al.*, 2008). La entrada de dos moléculas de ATP induce un cambio de conformación que cierra el complejo y la interfase (Figura 1.7), estabilizándose el dímero mediante la interacción de cada molécula de ATP con el dominio de unión de ATP de un monómero y el lazo C del monómero opuesto (Oldham *et al.*, 2008).

No existen datos fiables concluyentes acerca del número de moléculas de ATP hidrolizadas por molécula de sustrato transportado. Trabajando con distintos sistemas reconstituidos *in vitro* se han obtenido valores que oscilan entre 1 y 17 moléculas de ATP hidrolizadas por molécula de sustrato transportada (Boos y Lucht, 1996). Sin embargo, las medidas *in vivo*, así como las medidas *in vitro* más

recientes, dan resultados más homogéneos, obteniéndose un valor aproximado de 2 moléculas de ATP hidrolizadas por molécula de sustrato transportada (Mimmack *et al.*, 1989; Patzlaff *et al.*, 2003), lo que estaría en consonancia con el hecho de que existan dos subunidades ATPasa por complejo de membrana. Aunque parece existir un mayor grado de similitud entre los componentes conservados de los sistemas exportadores que entre los de sistemas importadores, a partir de su secuencia de aminoácidos no se puede predecir si un sistema particular pertenece a una categoría u otra ni la especificidad de sustrato del mismo (Higgins *et al.*, 1990; Davidson *et al.*, 2008).

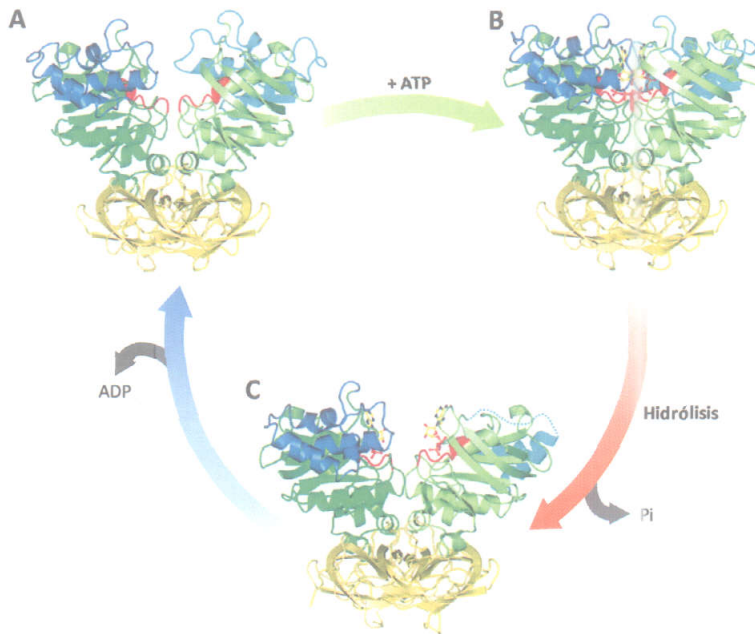


Figura 1.7. Cambios de conformación en un dímero de ATPasas durante un ciclo de hidrólisis de ATP. Se muestra la estructura de un homodímero de la ATPasa Malk, perteneciente al sistema de transporte de maltosa de *E. coli*. Las regiones del dominio de unión de ATP de cada ATPasa se muestran en verde y azul, y contienen el motivo de Walker de unión de ATP, que se muestra en rojo. A, estado de reposo en ausencia de nucleótidos, en el que los dos dominios de unión de ATP de las dos subunidades no están en contacto. B, estado de unión de ATP o de pre-hidrólisis, en el que los dominios de unión de ATP se cierran y entran en contacto permitiendo la hidrólisis de ATP. C, estado de post-hidrólisis, que se produce tras la hidrólisis de ATP y la liberación de Pi, permitiendo la apertura del homodímero y la separación de los dominios de unión de ATP. Por último, el ADP se libera de Malk, permitiendo reiniciar el ciclo. Figura adaptada de Lu *et al.* (2005).

1.1.5.2. Proteínas integrales de membrana.

Las proteínas integrales de membrana presentan varios dominios hidrofóbicos constituidos por hélices α separados por segmentos hidrofílicos. Normalmente poseen 6 hélices α y 5 lazos hidrofílicos, dos de los cuales se localizan en el lado citoplásmico, al igual que los extremos carboxilo y amino de la proteína, y los otros tres en el lado periplásmico (Higgins, 1992). Sin embargo, la estructura de estas proteínas es variable, habiéndose encontrado también proteínas integrales de membrana con 10, 9, 8, 7 ó 5 hélices α (Saier *et al.*, 2006; Hollenstein *et al.*, 2007; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). Aunque no existe una gran similitud entre las secuencias de estos componentes, se ha definido un motivo conservado situado a unos 90 aminoácidos del extremo carboxílico, denominado lazo EAA (Glu-Ala-Ala) (Saurin *et al.*, 1994), cuya secuencia consenso es EAA₃GN₃INLP, que constituye el sitio de interacción de estas proteínas con el lazo Q de las proteínas de unión de ATP (Mourez *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 2008). Actualmente se asume que los cambios de conformación que se producen en las proteínas de unión de ATP al hidrolizar el ATP se transmiten a los dominios transmembrana por medio de esta interacción, provocando una reorganización de las hélices α transmembrana y el acoplamiento del transporte (Figura 1.8) (Davidson y Maloney, 2007).

Cada sistema de transporte de tipo ABC contiene dos proteínas de membrana que se presentan como un homodímero o un heterodímero, dependiendo de la existencia de uno o dos genes distintos para las mismas, aunque también se da el caso de pseudodímeros cuando una única proteína consta de dos mitades homólogas entre sí (Higgins, 1992; Saurin y Dassa, 1994; Davidson y Maloney, 2007). Las dos proteínas de membrana rodean y definen el canal de translocación por donde tiene lugar el transporte, pudiendo adoptar dos estados de conformación diferentes denominados estado cerrado o de reposo (Figura 1.8A), cuando el canal de translocación se expone al citoplasma, y estado abierto (Figura 1.8B), cuando el canal de translocación se expone al periplasma (Oldham *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2008). El canal de translocación presenta un sitio de unión central de baja afinidad para el sustrato (Speiser y Ames, 1991; Oldham *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2008) que se expone alternativamente al interior o al exterior de la célula, pero nunca simultáneamente a ambos lados (Mitchell, 1957; Jardetzky, 1966; Yan y Maloney, 1993), lo cual asegura que en ningún momento haya un canal abierto que permita un movimiento no regulado de sustratos (Davidson y Maloney, 2007). Este mecanismo de alternancia del canal de translocación entre el estado cerrado y el estado abierto podría estar inducido por la unión de ATP a las ATPasas (Pinkett *et al.*, 2007). Dadas las diferencias existentes, no parece existir relación filogenética entre estas proteínas y las proteínas de membrana de los sistemas de transporte secundario, de manera que la estructura de alrededor de 12 hélices α de ambos tipos de sistemas podría haber surgido por convergencia hacia una estructura adecuada para el transporte de sustratos a través de bicapas lipídicas (Henderson, 1993). Sin embargo, resultados recientes parecen indicar que los sistemas de transporte secundario y los transportadores de tipo ABC presentan una gran similitud con respecto al mecanismo de translocación (Kuroda *et al.*, 1997; Driessen *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2003; van der Does y Tampé, 2004), por lo que los segundos podrían haber surgido a partir de los primeros al asociarse a subunidades citosólicas de hidrólisis de ATP (van der Does y Tampé, 2004).

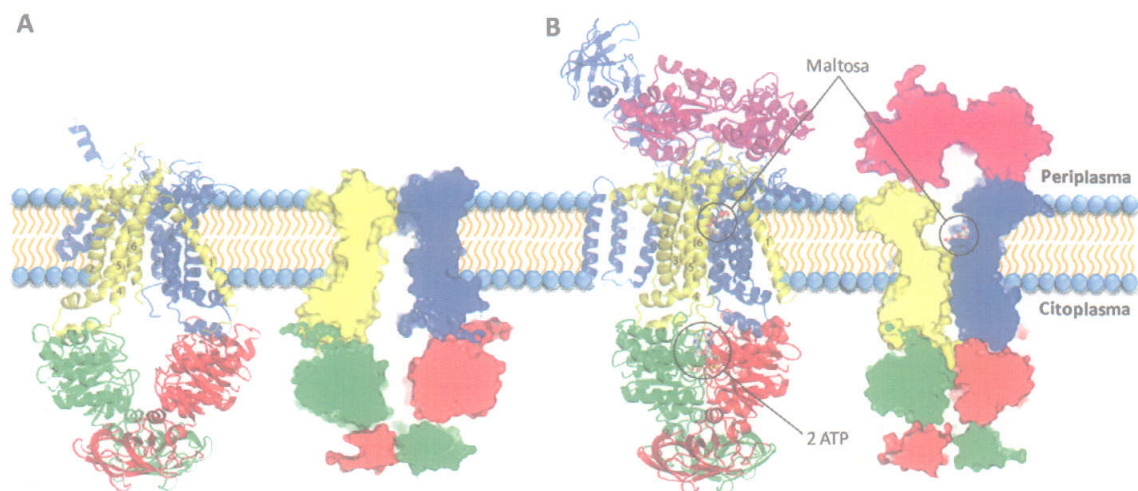


Figura 1.8. Cambios de conformación en las subunidades transmembrana del transportador de maltosa MBP-MalFGK₂ de *E. coli*. A, estado de reposo del complejo MalFGK₂ en ausencia de ATP y de la proteína periplásmica de unión de maltosa del sistema, MBP (del inglés *Maltose Binding Protein*), en el que el sitio de unión de maltosa del canal de translocación se expone al citoplasma. B, estado abierto del complejo MalFGK₂ en presencia de ATP, de maltosa y de la proteína MBP en el que se muestra el canal de translocación expuesto al periplasma. Se muestran las moléculas de ATP en el dímero de ATPasas MalK y una molécula de maltosa en el canal de translocación. Figura adaptada de Khare *et al.* (2009).

1.1.5.3. Proteína periplásmica de unión de sustrato.

El espacio periplásmico es exclusivo de las bacterias Gram-negativas y es un ambiente relativamente fluido, comparable al citoplasma en cuanto a sus propiedades físicas (Elowitz *et al.*, 1999; Mullineaux *et al.*, 2006). Las proteínas de unión de sustrato, localizadas en el espacio periplásmico, tienen una alta afinidad por sus sustratos, con valores de K_d entre 0,01 y 1 μ M (Davidson *et al.*, 2008), y son los

receptores primarios para el transporte, encontrándose en exceso entre 50 y 100 veces con respecto al resto de los componentes del sistema (di Guan *et al.*, 1988). Aunque normalmente sólo hay una proteína de este tipo para cada sistema, en algunos casos existe más de una proteína periplásmica capaz de interactuar con un mismo complejo de membrana, como es el caso del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de *E. coli* que puede actuar con las proteínas periplásmicas LivK, que une específicamente Leu, y LivJ, que une Leu, Ile, Val y Thr (Adams *et al.*, 1990). En bacterias Gram-positivas, que carecen de membrana externa y, por lo tanto, de espacio periplásmico, estas proteínas son lipoproteínas ancladas por su extremo amino a la membrana plasmática (Gilson *et al.*, 1988). Algunas proteínas periplásmicas pueden actuar como receptores quimiotácticos, pudiendo interactuar no sólo con el sistema de transporte sino también con la proteína de membrana que constituye el quimiorreceptor, disparando de este modo la respuesta celular a un gradiente químico determinado (Tam y Saier, 1993). Las proteínas periplásmicas conocidas varían en tamaño, entre 25 y 59 kDa y, a pesar de la poca similitud entre sus secuencias, su estructura está muy conservada (Higgins *et al.*, 1990; Quiocho y Ledvina, 1996), consistiendo en dos dominios globulares, el lóbulo N y el lóbulo C, conectados por una charnela flexible donde se une el sustrato (Figura 1.9A) (Quiocho, 1990; Wilkinson y Verschueren, 2003). En ausencia del sustrato, las proteínas periplásmicas se disponen en una conformación abierta en la que los dos lóbulos se mantienen separados por una hendidura accesible al solvente por donde puede entrar el sustrato. Cuando el sustrato ocupa esta hendidura provoca un cambio de conformación en la proteína y los dos dominios se aproximan, adoptando ésta una conformación cerrada que facilita la interacción con los componentes de membrana del sistema y permite iniciar la translocación del sustrato (Figura 1.9B) (Wilkinson y Verschueren, 2003; Davidson *et al.*, 2008).

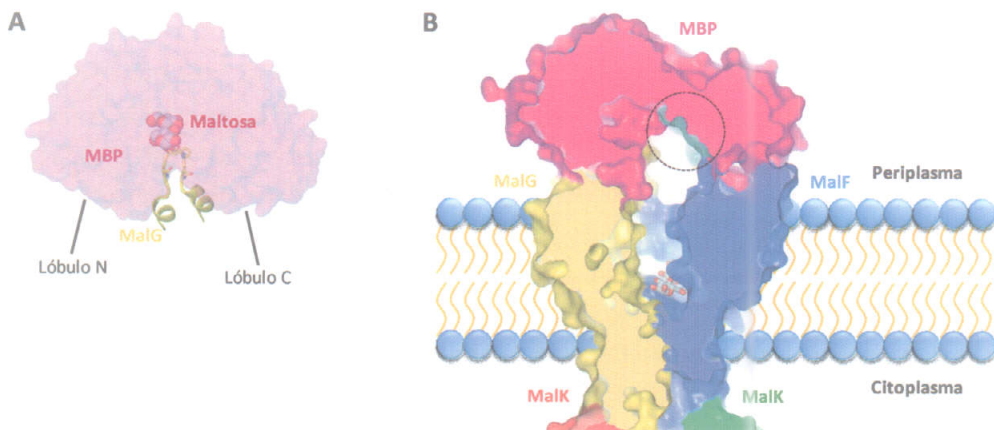


Figura 1.9. Estructura de la proteína periplásmica MBP del sistema de transporte de maltosa MBP-MalFGK₂ de *E. coli*. A, estructura de la proteína periplásmica MBP en la conformación cerrada, conteniendo una molécula de maltosa unida en la hendidura localizada entre los lóbulos N y C. Se muestra la inserción de un lazo de la subunidad transmembrana MalG en el sitio de unión de sustrato de la proteína MBP cuando ésta interactúa con el sistema. B, transferencia de la maltosa desde la proteína MBP al sitio de unión localizado en las subunidades de membrana, mostrando la cavidad que se forma entre las tres proteínas al interactuar la proteína periplásmica con el sistema. Se indica el sitio de unión de sustrato del canal de translocación con una molécula de maltosa unida a él. Los residuos de la proteína periplásmica MBP que constituyen el sitio de unión de sustrato en la conformación abierta se muestran en azul (rodeados por un círculo). Figura adaptada de Oldham *et al.* (2007).

Las proteínas periplásmicas de unión de sustrato se han clasificado en función del tipo de charnela que presentan (Davidson *et al.*, 2008), habiéndose observado que las de un sustrato dado de distintos organismos están más relacionadas entre sí que las de unión de distintos sustratos de un mismo organismo (Tam y Saier, 1993). Por otro lado, en algunos casos se ha observado homología entre la proteína de unión de sustrato de algunos azúcares y la proteína reguladora que se une a la región promotora de genes que determinan proteínas del metabolismo de dicho azúcar y cuya actividad es

modulada por la unión del mismo (Weickert y Adhya, 1992). Las proteínas periplásmicas son necesarias para que los sistemas de transporte ABC sean eficientes tanto a altas como a bajas concentraciones de sustrato (Shuman, 1982; Dippel y Boos, 2005), permitiendo que las células puedan concentrar los nutrientes en su interior hasta un millón de veces cuando están presentes en el medio externo a concentraciones submicromolares (Dippel y Boos, 2005). Además, las proteínas periplásmicas podrían tener un papel importante en la recuperación de sustratos que se perdiesen del citoplasma (Montesinos *et al.*, 1997).

1.1.5.4. Organización de los genes que determinan transportadores de tipo ABC.

En bacterias, los genes que determinan los distintos componentes de estos transportadores suelen presentarse formando operones, siendo pocos los casos en los que un componente forma parte de otra unidad transcripcional. Esta organización podría asegurar la estequiometría adecuada entre los distintos componentes del transportador (Ames, 1986; Ames y Joshi, 1990). Dado que la proteína periplásmica es la más abundante de los componentes del sistema, el gen que la determina suele encontrarse al principio del operón. Esta localización podría permitir una expresión relativa mayor de esta proteína, ya que una capacidad limitada de elongación de la transcripción junto con una degradación preferente del mRNA en sentido 3'→5' pueden producir un gradiente de expresión a través del operón favoreciendo la de los genes situados más cerca del extremo 5' del mismo (Boos y Lucht, 1996). Sin embargo, cuando existen dos proteínas periplásmicas para un mismo sistema de transporte, el gen correspondiente a una de ellas generalmente no se encuentra en el operón principal, sino que es independiente (Boos y Lucht, 1996).

1.1.5.5. Modelo del mecanismo de transporte.

Teniendo en cuenta una serie de datos experimentales, se ha propuesto un modelo de funcionamiento de los sistemas de transporte de tipo ABC (Chen *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2008). En ausencia del sustrato, el transportador permanecería en el estado cerrado o de reposo, en el cual el dímero de proteínas de unión de ATP se encuentra en la conformación abierta sin contener moléculas de ATP unido y el canal de translocación está expuesto sólo al citoplasma (Figura 1.10A). Cuando el sustrato entra en el espacio periplásmico, se uniría de manera reversible a las proteínas periplásmicas específicas allí presentes. La concentración de sustrato libre es la misma dentro del periplasma y en el medio externo, pero la concentración total (sustrato libre y sustrato unido a proteína) es mayor dentro, siendo dependiente de la concentración de la proteína periplásmica y de la afinidad de ésta por el sustrato. La interacción de la proteína periplásmica con su sustrato produciría en ella un cambio de conformación de la forma abierta a la cerrada, aumentando con ello su afinidad por el complejo de membrana con el que interacciona. Esta interacción se produciría de forma concomitante con la unión de dos moléculas de ATP al dímero de ATPasas, induciéndose de este modo un cambio en la conformación tanto de este dímero, que pasaría al estado cerrado y activaría la hidrólisis de ATP, como de los componentes de membrana, que pasarían al estado abierto, quedando el canal de translocación expuesto sólo al periplasma para facilitar la transferencia del sustrato desde la proteína periplásmica hasta el sitio de unión central de los componentes de membrana (Figura 1.10B). La hidrólisis de ATP en uno o los dos dominios de unión de ATP desestabilizaría al dímero de ATPasas, con lo que el sistema volvería al estado cerrado o de reposo, descargándose el sustrato en el citoplasma (Figura 1.10C). Finalmente, el dímero de proteínas de unión de ATP se abriría para liberar el nucleótido o los nucleótidos unidos y la proteína periplásmica se disociaría del complejo de membrana, permitiendo así que el ciclo pudiera volver a comenzar (Davidson y Maloney, 2007; Oldham *et al.*, 2008; Orelle *et al.*, 2008).

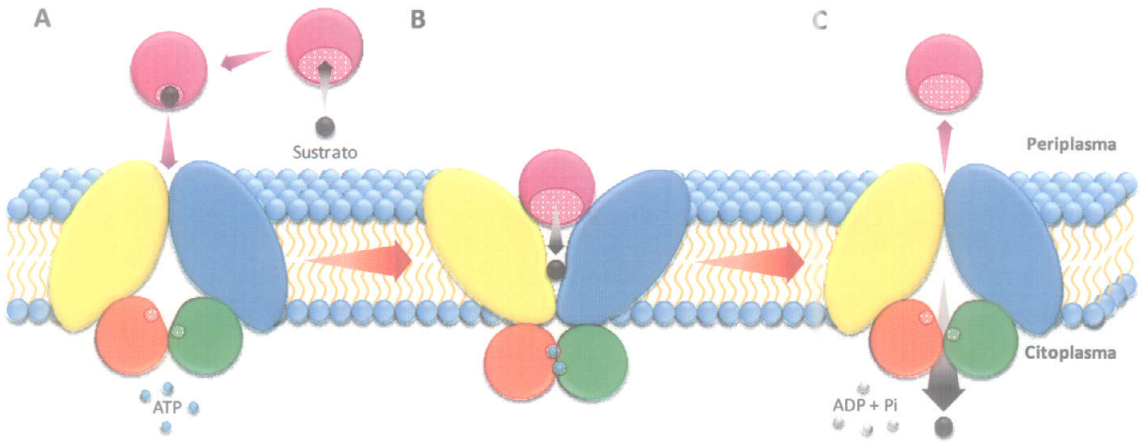


Figura 1.10. Modelo del mecanismo de transporte de los transportadores ABC. Se muestra el modelo de acceso alternado para la incorporación de maltosa a través del sistema de transporte MBP-MalFGK₂ de *E. coli*. A, estado cerrado o de reposo en ausencia de maltosa, en la que el dímero de ATPasas se encuentra en la conformación abierta y el canal de translocación está expuesto al citoplasma. Al unirse la maltosa a la proteína periplásmica MBP se produce en ésta un cambio de conformación de la forma abierta a la cerrada, permitiendo su interacción con las subunidades transmembrana del sistema. B, en presencia de ATP, la interacción de la proteína periplásmica MBP con las subunidades transmembrana induce un cambio de conformación del sistema en el que las ATPasas se aproximan y las subunidades transmembrana se reorientan exponiendo el canal de translocación al periplasma, pasando el complejo a adoptar la conformación abierta. En este estado se facilita la transferencia de la maltosa desde la proteína periplásmica al sitio de unión de sustrato de las subunidades transmembrana. C, tras la hidrólisis de ATP el dímero de ATPasas se desestabiliza y el complejo vuelve al estado cerrado o de reposo, permitiendo que se complete la translocación de la maltosa a través de la membrana plasmática. Figura adaptada de Chen *et al.* (2001), Oldham *et al.* (2008) y Davidson *et al.* (2008).

1.2. Transportadores de aminoácidos.

1.2.1. Generalidades.

Los aminoácidos son los sillares de las proteínas, pero también son intermediarios clave de una gran variedad de procesos celulares importantes en bacterias, como la producción de energía, el metabolismo del carbono y el nitrógeno, la homeostasis del pH, la osmoprotección, la síntesis de la pared celular, la producción de antibióticos, la transducción de señales y la comunicación intercelular (Saier, 2000b; Hosie y Poole, 2001; Jung *et al.*, 2006). Los aminoácidos pueden ser aniónicos, catiónicos o *zwitteriónicos* y sus cadenas laterales pueden ser hidrofóbicas, semipolares o fuertemente hidrofílicas, lo que pone de manifiesto la diversidad química que presentan. Estas cadenas laterales pueden ser, a su vez, alifáticas o aromáticas, y en ciertas ocasiones pueden servir como importantes donadores o aceptores fisiológicos de protones (Saier, 2000b). Por otra parte, los aminoácidos en las proteínas pueden ser modificados por metilación, acetilación, formilación y fosforilación, y los derivados L-aminoacilo así generados se pueden condensar enzimáticamente con otros L-aminoácidos, con aminoácidos de la configuración D y con hidroxiaácidos para generar péptidos de composición poco común. Estos derivados de residuos aminoacilo son utilizados en una amplia variedad de funciones biológicas, como sistemas de defensa y ataque, sensores de densidad de población, señalización intercelular y regulación de la expresión génica (Saier, 2000b). Así pues, no es sorprendente que haya evolucionado un amplio número de sistemas de transporte para controlar y facilitar el intercambio de aminoácidos y derivados de aminoácidos entre las células y el medio que las rodea, sus orgánulos y otras estructuras de los seres vivos (Saier, 2000b; Hosie y Poole, 2001).

Tabla 1.2. Superfamilias y familias de proteínas canal y transportadores de aminoácidos y derivados de aminoácidos de bacterias, arqueas y eucariotas. Las superfamilias y familias están ordenadas según su número en el sistema de clasificación TC (Saier, 2000b; Jung et al., 2006), indicando el número de segmentos transmembrana que presentan los miembros de cada una de ellas.

Nombre de la superfamilia o familia	TC	Fuente de energía	TMS [†]
Canales o poros			
PLM, <i>Phospholemman family</i> ^E	1.A.27	Transporte pasivo	(1) _n
Portadores secundarios			
MFS, <i>Major Facilitator superfamily</i> ^{ABE}	2.A.1	Cotransporte soluto:H ⁺	12
APC, <i>Amino Acid-Polyamine-Organocation superfamily</i> ^{ABE}	2.A.3	Cotransporte soluto:H ⁺ Antiporte aa:poliamina	12
DMT, <i>Drug/Metabolite Transporter superfamily</i> ^{ABE}	2.A.7	Antiporte droga/metabolito:H ⁺	10
Dcu, <i>Ca-Dicarboxylate Uptake family</i> ^B	2.A.13	Antiporte dicarboxilato:dicarboxilato (Asp/Malato/Fumarato/Succinato)	10-12
BCCT, <i>Betaine/Carnitine/Choline Transporter family</i> ^B	2.A.15	Cotransporte soluto:H ⁺	12
POT, <i>Proton-dependent Oligopeptide Transporter family</i> ^{BE}	2.A.17	Cotransporte soluto:H ⁺	12
AAAP, <i>Amino Acid/Auxin Permease family</i> ^E	2.A.18	Cotransporte aa/auxina:H ⁺	11
SSS, <i>Solute:Sodium Symporter family</i> ^{ABE}	2.A.21	Cotransporte soluto:Na ⁺	12-15
NSS, <i>Neurotransmitter:Sodium Symporter family</i> ^{ABE}	2.A.22	Cotransporte soluto:Na ⁺	12
DAACS, <i>Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter family</i> ^{ABE}	2.A.23	Cotransporte dicarboxilato/aa:H ⁺ /Na ⁺	8-12
AGCS, <i>Alanine/Glycine:Cation Symporter family</i> ^{AB}	2.A.25	Cotransporte Ala/Gly:Na ⁺ /H ⁺	8-12
LIVCS, <i>Branched Chain Amino Acid (Leucine-Isoleucine-Valine):Cation Symporter family</i> ^B	2.A.26	Cotransporte aa ramificado:Na ⁺ /H ⁺	12
ESS, <i>Glutamate (E):Sodium Symporter family</i> ^B	2.A.27	Cotransporte Glu:Na ⁺	10-12
MC, <i>Mitochondrial Carrier family</i> ^E	2.A.29	Antiporte soluto:soluto	6
HAAAP, <i>Hydroxy/Aromatic Amino Acid Permease family</i> ^B	2.A.42	Cotransporte aa aromático o hidroxiaminoácido:H ⁺	11
TRAP-T, <i>Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter family</i> ^{AB}	2.A.56	Cotransporte soluto:H ⁺ /Na ⁺	12 + 4 + SBP [§]
LysE, <i>L-Lysine Exporter family</i> ^{AB}	2.A.75	Cotransporte Lys:H ⁺ Antiporte Lys:OH ⁻	5 ó 6 5 ó 6
RhtB, <i>Resistance to Homoserine/Threonine family</i> ^{AB}	2.A.76	Antiporte aa:H ⁺ (exportación)	5 ó 6
LIV-E, <i>Branched Chain Amino Acid (Leucine-Isoleucine-Valine) Exporter family</i> ^{ABE}	2.A.78	Antiporte aa ramificado:H ⁺	4 + 7
ThrE, <i>Threonine/Serine Exporter family</i> ^{ABE}	2.A.79	Antiporte Thr/Ser:H ⁺	¿10?
AAE, <i>Aspartate/Alanine Exchanger family</i> ^{AB}	2.A.81	Antiporte Asp:Ala	8
Transportadores primarios			
ABC, <i>ATP-binding Cassette superfamily</i> ^{AB}	3.A.1		(5) ₂
PAAT, <i>Polar Amino Acid uptake Transporter family</i> ^{AB}	3.A.1.3		(6) ₂
HAAT, <i>Hydrophobic Amino Acid Uptake Transporter family</i> ^{AB}	3.A.1.4	Hidrólisis de ATP	Variable
QAT, <i>Quaternary Amine Uptake Transporter family</i> ^{AB}	3.A.1.12		+ SBP [§]
MUT, <i>Methionine Uptake Transporter family</i> ^{AB}	3.A.1.24		

[†]TMSs, segmentos transmembrana hidrofóbicos en hélice α (del inglés *Transmembrane Spanners*).

[§]SBP, proteína periplásmica de unión de sustrato (del inglés *Solute Binding Protein*).

^AArqueas; ^BBacterias; ^EEucariotas.

Hasta la fecha, se conocen en torno a 270 superfamilias y familias de poros o proteínas canal, unas 30 superfamilias y familias de sistemas de transporte activo primario y aproximadamente 110 superfamilias y familias de portadores secundarios (Saier et al., 2006; Saier et al., 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). De todas las superfamilias y familias descritas, únicamente pueden transportar aminoácidos y derivados relacionados estructuralmente los canales de la familia PLM (Kirk y Strange, 1998), las porinas inespecíficas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y de los orgánulos eucarióticos (TC 1.B), algunos miembros de la superfamilia ABC de los transportadores primarios (Saurin et al., 1999) y las permeasas de 21 superfamilias y familias diferentes de portadores secundarios (Tabla 1.2) (Saier, 2000b; Jung et al., 2006). Sin embargo, pese a que los portadores secundarios son el grupo más diverso dentro de los sistemas que transportan aminoácidos, los

transportadores ABC de aminoácidos tienen una gran relevancia, debido a su importancia fisiológica y a que son los sistemas de transporte de tipo ABC mejor estudiados (Hosie y Poole, 2001). Es de particular interés que una especie bacteriana pueda presentar muchos sistemas de transporte diferentes para un mismo aminoácido o una familia de aminoácidos (Hosie y Poole, 2001).

Con el fin de determinar las características generales de estas dos docenas de superfamilias y familias de permeasas de aminoácidos y derivados de aminoácidos, se han llevado a cabo estudios detallados de las propiedades de algunos de sus miembros. Así, se ha observado que el espectro de sustratos transportados por cada miembro de una familia determinada puede ser estrecho o amplio, dependiendo del transportador, y una familia completa puede transportar con frecuencia una amplia variedad de compuestos relacionados estructuralmente. Sin embargo, en raras ocasiones los miembros de una misma familia median el transporte de compuestos divergentes estructuralmente (Saier, 2000b). Algunas familias de permeasas de aminoácidos con secuencias relacionadas se encuentran distribuidas ampliamente en la mayoría de los grupos de organismos, incluyendo los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, mientras que otras familias se restringen a uno de los tres dominios (Saier, 2000b). Por otra parte, con muy pocas excepciones, como las superfamilias MFS y ABC, todos los miembros de una familia definida filogenéticamente funcionan con una fuerte polaridad preferente dirigida hacia el interior o hacia el exterior, y en raras ocasiones miembros diferentes de una misma familia de transportadores transportan solutos con polaridad opuesta (Saier, 2000b). En cuanto a las funciones que desempeñan estos sistemas de transporte, algunas familias median selectivamente la incorporación o la liberación de aminoácidos específicos y/o sus derivados para propósitos de nutrición, protección celular o señalización intercelular. Aunque parece claro que los miembros de una familia pueden haber evolucionado para proporcionar funciones fisiológicas específicas, la especialización en una función fisiológica concreta parece ser una característica evolutiva adquirida tardíamente, por lo que es de poca importancia para la clasificación de este grupo de transportadores (Saier y Tseng, 1999). Así pues, en los sistemas de transporte de aminoácidos y derivados de aminoácidos se puede considerar que los mecanismos de transporte y acoplamiento de energía son rasgos evolutivos muy conservados, la topología de las proteínas, la polaridad del transporte y la especificidad de sustrato son rasgos conservados en un grado intermedio, y los mecanismos de regulación y la especialización funcional son rasgos poco conservados y adquiridos tardíamente durante la evolución (Saier, 2000b).

1.2.2. Portadores secundarios de aminoácidos.

Como se ha indicado, entre los sistemas de transporte de aminoácidos y sus derivados, los portadores secundarios son el grupo más numeroso y extendido tanto en procariotas como en eucariotas (Tabla 1.2) (Saier, 2000b; Jung *et al.*, 2006). En él hay familias con permeasas específicas de aminoácidos pequeños (familia AGCS), aminoácidos alifáticos (familias LIVCS y LIV-E), aminoácidos aromáticos (familia HAAAP), aminoácidos ácidos (familias DAACS y ESS) y aminoácidos básicos (superfamilia APC y familia LysE) (Jung *et al.*, 2006), si bien por su extensión en cuanto a miembros que contienen y a organismos en los que están presentes destacan las superfamilias MFS y APC (Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). Algunas de las familias de permeasas de aminoácidos están presentes en bacterias, arqueas y eucariotas, si bien existen otras que contienen miembros exclusivos de procariotas (bacterias y arqueas) (Saier, 2000b). En general, los sistemas de transporte secundario de aminoácidos son muy específicos, discerniendo los aminoácidos en función del tamaño, la polaridad y la carga de sus cadenas laterales, y en la mayoría de los casos estas permeasas presentan una afinidad que está en el rango de concentraciones micromolares (Jung *et al.*, 2006).

La superfamilia MFS, como se ha comentado en el apartado 1.1.4, es una familia muy grande y diversa que reúne permeasas que transportan prácticamente cualquier tipo de sustrato. Su implicación en el transporte de aminoácidos reside en algunos miembros de sus familias, entre los que destaca la familia MHS (del inglés *Metabolite:H⁺ Symporter family*; TC 2.A.1.6), que incluye permeasas de importación de prolina, como ProP de *E. coli* (Saier, 2000b; Jung et al., 2006).

La superfamilia APC de proteínas de transporte incluye más de 250 miembros secuenciados que funcionan como cotransportadores soluto:H⁺ y antiportadores soluto:soluto (Closs et al., 1993; Reizer et al., 1993; Sophianopoulou y Diallinas, 1995; Isnard et al., 1996; Kashiwagi et al., 1997; Brechtel y King, 1998; Hu y King, 1998a, b; Sanders et al., 1998; Sato et al., 1999; Saier, 2000b; Chang et al., 2004; Jung et al., 2006). Estas proteínas están distribuidas ampliamente, encontrándose en bacterias, arqueas, levaduras, hongos, protistas, plantas y animales (Saier, 2000b), y están implicadas generalmente en el transporte de aminoácidos, si bien en algunos casos funcionan como receptores de aminoácidos en lugar de transportadores (Cabrera-Martínez et al., 2003). Presentan tamaños enormemente variados, aunque las proteínas más pequeñas generalmente son de origen procariótico y las más grandes de origen eucariótico (Saier, 2000b). En este grupo de transportadores destacan las familias AAT (del inglés *Amino Acid Transporter family*; TC 2.A.3.1), con miembros que pueden transportar varios tipos de aminoácidos, y APA (del inglés *Basic Amino Acid/Polyamine Antiporter family*; TC 2.A.3.2), con miembros que pueden transportar aminoácidos básicos. Ambas familias están ampliamente distribuidas en bacterias y contienen miembros bien estudiados en *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *P. aeruginosa* (Saier et al., 2006; Saier et al., 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>).

Por otra parte, la familia DAACS reúne miembros que catalizan un simporte de Na⁺ y/o H⁺ junto con (a) un dicarboxilato del ciclo de Krebs (malato, succinato o fumarato), (b) un aminoácido dicarboxílico (Glu o Asp), (c) un aminoácido neutro semipolar pequeño (Ala, Ser, Cys o Thr) (Arriza et al., 1993; Ogawa et al., 1998), (d) aminoácidos neutros y ácidos o (e) aminoácidos dibásicos (Reizer et al., 1994; Palacín et al., 1998; Zerbiv et al., 1998). Esta familia presenta miembros bacterianos y de mamíferos, siendo los primeros algo más pequeños que los segundos. Estas permeasas poseen entre 8 y 12 posibles segmentos transmembrana en hélice α (Slotboom et al., 1999), habiéndose determinado la estructura tridimensional de una de ellas (Yernool et al., 2004; Boudker et al., 2007), la cual se constituye en un trímero. Todas las proteínas bacterianas de esta familia se agrupan juntas en el árbol filogenético de la misma (Saier et al., 1999b).

Además de las superfamilias MFS y APC y la familia DAACS, con miembros presentes en procariotas y eucariotas, también existen otras familias de transportadores secundarios específicos de procariotas que incluyen miembros con especificidad para aminoácidos y derivados de aminoácidos. Estas familias son pequeñas casi sin excepción, con pocos miembros secuenciados en la actualidad (Saier et al., 2006; Saier et al., 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>), y se denominan Dcu, BCCT, AGCS, LIVCS, ESS, HAAAP, TRAP-T, LysE, RhtB y AAE (Tabla 1.2). Seis de estas diez familias incluyen proteínas con propiedades que, en general, son características de los transportadores secundarios de importación de solutos, ya que funcionan sólo por cotransporte con iones H⁺ o Na⁺ y generalmente están formados por cadenas polipeptídicas únicas (Saier, 2000b; Jung et al., 2006). En la mayoría de los casos funcionan en ausencia de subunidades auxiliares, salvo en el caso de la familia TRAP-T, que se describió en el apartado 1.1.4. En esta familia se ha encontrado también un miembro en *Synechocystis* sp. PCC 6803, GtrABC, que media la incorporación dependiente de Na⁺ del aminoácido Glu y en el que GtrA y GtrB son las proteínas transmembrana pequeña y grande, respectivamente, y GtrC corresponde a la proteína periplásmica de unión de sustrato (Quintero et al., 2001; Thomas et al., 2006). Por el contrario, las proteínas de las familias LysE y RhtB caracterizadas exportan aminoácidos probablemente por un mecanismo de antiporte con un H⁺, si bien en la familia LysE puede ocurrir también por un simporte de

grupos OH⁻ (Vrlljic *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). En *C. glutamicum*, la permeasa LysE parece mediar la exportación unidireccional de L-Lys y de otros aminoácidos básicos como L-Arg o L-Orn (Vrlljic *et al.*, 1999; Sailer, 2000b). En cuanto a los miembros caracterizados de la familia LIVCS, éstos transportan aminoácidos alifáticos de cadena ramificada, como Leu, Ile y Val, mediante un simporte con iones H⁺ o Na⁺ (Sailer, 2000b; Jung *et al.*, 2006), y se encuentran en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Reizer *et al.*, 1994; Stucky *et al.*, 1995; Tauch *et al.*, 1998). Por otra parte, en las permeasas de la familia ESS destaca el transportador GltS de *E. coli*, que media un simporte Glu:Na⁺ (Deguchi *et al.*, 1990; Sailer, 2000b; Jung *et al.*, 2006; Szvetnik *et al.*, 2007), habiéndose descrito homólogos en otras bacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Quintero *et al.*, 2001). Por último, la familia HAAAP incluye permeasas bien caracterizadas en *E. coli* que funcionan mediante un simporte de iones H⁺ y un aminoácido aromático (Trp o Tyr) (Wookey y Pittard, 1988; Sarsero *et al.*, 1991; Sarsero y Pittard, 1995) o un hidroxiaminoácido (Ser o Thr) (Goss *et al.*, 1988; Shao *et al.*, 1994), existiendo homólogos en un gran número de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Sailer, 2000b; Chang *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2006).

1.2.3. Sistemas ABC de transporte de aminoácidos.

La superfamilia de los transportadores ABC reúne en la actualidad a 77 familias reconocidas, de las que 27 incluyen exclusivamente miembros que son sistemas de incorporación, todos ellos exclusivos de procariotas (bacterias y arqueas), otras 38 familias engloban a sistemas de exportación específicos de bacterias, y las 12 familias restantes reúnen a permeasas que son en su mayoría sistemas de exportación específicos de eucariotas (Sailer *et al.*, 2006; Sailer *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>).

De las 27 familias de sistemas de importación procarióticos, cuatro están constituidas por sistemas de transporte de aminoácidos (Tabla 1.2) (Sailer *et al.*, 2006; Sailer *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>), que se clasifican atendiendo a la similitud de secuencias que presentan las proteínas integrales de membrana (Saurin *et al.*, 1994). Estas cuatro familias son la familia de transportadores de aminoácidos polares PAAT, la familia de transportadores de aminoácidos hidrofóbicos HAAT (Dassa y Bouige, 2001; Hosie y Poole, 2001), la familia de transportadores de aminas cuaternarias QAT (Fox *et al.*, 2008) y la familia de transportadores de metionina MUT (Zhang *et al.*, 2003).

La familia PAAT es la mayor de las cuatro, con 20 miembros reconocidos actualmente, mientras que las familias HAAT, QAT y MUT engloban a 6, 10 y 3 miembros caracterizados, respectivamente (Sailer *et al.*, 2006; Sailer *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). De estos sistemas de transporte destaca el sistema LIV (Leucina-Isoleucina-Valina) de *E. coli* de la familia HAAT, y homólogos del mismo en otras bacterias como el sistema Bra de aminoácidos de cadena lateral ramificada (del Inglés *Branched Chain Amino Acids*) de *P. aeruginosa* (Hosie y Poole, 2001). Muchos de los sistemas de importación de tipo ABC parecen mediar reacciones vectoriales irreversibles, aunque se ha descrito que los sistemas de transporte de aminoácidos Aap y Bra de *Rhizobium leguminosarum* e His de *Salmonella typhimurium* pueden mediar tanto la importación activa como la exportación pasiva (Hosie *et al.*, 2001).

1.2.3.1. Características generales de la familia PAAT.

La familia PAAT incluye transportadores de aminoácidos con cadenas laterales polares o cargadas, como la Arg, la Lys, la Orn, la Gln, el Glu, la cistina y el ácido diaminopimélico (Dassa y Bouige, 2001; Hosie y Poole, 2001). Por otra parte, en las agrobacterias, opinas como la octopina y la nopalina también se transportan por permeasas de esta familia. En general, los sistemas típicos de esta familia tienen dos

subunidades transmembrana, a excepción de los sistemas específicos de la cistina y la glutamina, que tienen sólo una (Dassa y Bouige, 2001).

Los transportadores de aminoácidos de esta familia se clasifican en dos grupos dependiendo de sus especificidades de sustrato (Hosie y Poole, 2001). El primer grupo reúne a los miembros que tienen una especificidad de sustrato muy estrecha, y generalmente sólo transportan un único aminoácido o un grupo de aminoácidos relacionados estructuralmente (Walshaw *et al.*, 1997). Algunos ejemplos son el sistema ArtPIQMJ de *E. coli*, que sólo transporta arginina (Wissenbach *et al.*, 1995), el sistema HisJQMP de *Salmonella typhimurium*, específico de aminoácidos básicos (His, Arg, Lys y Orn) (Higgins y Ames, 1981; Higgins *et al.*, 1982) y el sistema BgtAB de *Synechocystis* sp. PCC 6803, específico de aminoácidos básicos (Arg, His y Lis) y Gln (Quintero *et al.*, 2001). El segundo grupo engloba a transportadores caracterizados por presentar una baja especificidad de sustrato. De ellos destacan el transportador de Glu, Gln, Asp y Asn (BztABCD) de *R. capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996) y la permeasa general de aminoácidos AapJQMP de *R. leguminosarum*, que transporta L-aminoácidos ácidos, básicos y alifáticos y reconoce el rango más amplio de sustratos que se conoce para un transportador de este tipo (Walshaw y Poole, 1996). Este último sistema es poco común no sólo por su baja especificidad, sino también por su reversibilidad (Walshaw y Poole, 1996; Walshaw *et al.*, 1997). Una de las diferencias más llamativas entre los miembros de estos dos grupos es el tamaño de las proteínas integrales de membrana, teniendo los transportadores de baja especificidad de sustrato una extensión N-terminal que las hace en torno a un 30% mayor de lo normal, si bien se desconoce si esta extensión es necesaria para la especificidad de sustrato o tiene algún otro papel funcional (Hosie y Poole, 2001).

La disponibilidad de un grupo grande de sistemas de transporte de aminoácidos con distintas especificidades de sustrato facilita la búsqueda por comparación de residuos que puedan influir en la especificidad. Esto ha permitido identificar en las proteínas integrales de membrana una región N-terminal que abarca 63 residuos con similitud en todos los miembros de la familia PAAT, la cual parece ser importante en la especificidad de sustrato (Walshaw *et al.*, 1997; Hosie y Poole, 2001). En esta región, el residuo 52 es una prolina totalmente conservada, mientras que el residuo 53 es una prolina en la permeasa general de aminoácidos de *R. leguminosarum*, un residuo ácido en los transportadores de aminoácidos básicos y un residuo alifático en el resto de los transportadores. Por otra parte, el residuo 30 es una arginina o lisina en todos los transportadores a excepción del transportador de Arg Art de *E. coli*. En su lugar, en la proteína integral de membrana ArtQ aparece un residuo de Glu, mientras que en la otra proteína integral de membrana se encuentra una leucina. La importancia de esta región en la especificidad de sustrato se ha demostrado para el transportador His de *S. typhimurium*, en el que la eliminación de los residuos 25-28 (ILAV) cambia la especificidad de histidina a histidinol (Payne *et al.*, 1985).

1.2.3.2. Características generales de la familia HAAT.

La familia HAAT está compuesta por sistemas específicos para el transporte de aminoácidos neutros en general, aunque algunos son específicos de aminoácidos de cadena lateral ramificada y otros reconocen urea exclusivamente, y consiste en un grupo de transportadores identificados en *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum*, *R. leguminosarum*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Montesinos *et al.*, 1997; Dassa y Bouige, 2001; Hosie y Poole, 2001; Quintero *et al.*, 2001; Hosie *et al.*, 2002; Valladares *et al.*, 2002; Beckers *et al.*, 2004). La secuenciación de muchos genomas bacterianos ha permitido identificar homólogos también en otras especies como arqueas, bacterias resistentes a radiaciones ionizantes, bacterias hipertermófilas y proteobacterias. Al igual que la mayoría de los sistemas de transporte ABC de importación, los miembros de la familia HAAT están compuestos

por una o varias subunidades periplásmicas de unión de sustrato, dos subunidades transmembrana y dos subunidades de unión de ATP (Dassa y Bouige, 2001).

Los sistemas de transporte de alta afinidad de aminoácidos de cadena lateral ramificada de *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* (LIV-I en *E. coli* y *S. typhimurium* y Bra en *P. aeruginosa*) transportan los aminoácidos Leu, Ile y Val (Rahmanian *et al.*, 1973; Hoshino y Kose, 1990; Matsubara *et al.*, 1992) y, con menor afinidad, Ala y Thr en *P. aeruginosa* (Hoshino y Kageyama, 1980; Hoshino *et al.*, 1992) y Ala, Thr y Ser en *E. coli* (Rahmanian *et al.*, 1973; Robbins y Oxender, 1973). En *E. coli* y en *S. typhimurium*, el sistema LIV-I está constituido por 6 productos génicos, con dos proteínas periplásmicas de unión de sustrato que muestran diferente especificidad por aminoácidos, dos proteínas integrales de membrana y dos proteínas de unión de ATP (Adams *et al.*, 1990; Matsubara *et al.*, 1992), mientras que el sistema Bra en *P. aeruginosa* consta de 5 proteínas, teniendo sólo una proteína periplásmica de unión de sustrato (Hoshino y Kose, 1990).

Por último, en *R. leguminosarum* también se ha identificado un sistema de transporte que se engloba dentro de la familia HAAT, pese a que es una permeasa general de aminoácidos que puede transportar, además de los aminoácidos neutros Ala y Leu, aminoácidos ácidos y básicos (Glu, Arg e His) y algunos aminoácidos con configuración D (Hosie y Poole, 2001; Hosie *et al.*, 2002). Este sistema, denominado Bra_{Rl}, presenta, al menos, dos proteínas periplásmicas de unión de sustrato, las cuales pueden reconocer diferentes aminoácidos (Hosie *et al.*, 2002). Así pues, tanto este sistema como el Nat de *Synechocystis* sp. PCC 6803 reconocen un rango de aminoácidos más amplio que el de los sistemas LIV-I y Bra de *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*.

1.2.3.3. Características generales de la familia QAT.

La familia QAT comprende a sistemas de transporte de aminas cuaternarias, aunque algunos miembros pueden transportar aminoácidos (Boncompagni *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2008). Uno de estos miembros es el sistema Hut de *Sinorhizobium meliloti*, que es capaz de transportar His y Pro y está constituido por 3 productos proteicos determinados por el agrupamiento génico *hutXWV*, en el que el gen *hutX* determina una proteína periplásmica de unión de histidina y prolina, *hutW* determina una proteína transmembrana, y *hutV* determina una proteína de unión de ATP (Boncompagni *et al.*, 2000; Sailer *et al.*, 2006; Sailer *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tadb.org>).

1.2.3.4. Características generales de la familia MUT.

La familia MUT está constituida por transportadores implicados en el transporte de L- y D-metionina (Ayling y Bridgeland, 1972; Kadner, 1974, 1977; Ayling *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 2003). En estos sistemas destaca el transportador MetD de *E. coli* y *S. typhimurium*, que está constituido por los genes *metN*, *metI* y *metQ*, los cuales determinan una proteína de unión de ATP, una proteína transmembrana y una proteína periplásmica de unión de L- y D-metionina, respectivamente (Zhang *et al.*, 2003; Kadaba *et al.*, 2008).

1.3. Cianobacterias, asimilación de nitrógeno y heterocistos.

1.3.1. Las cianobacterias.

Las cianobacterias son bacterias con una estructura celular Gram-negativa, portando una membrana externa por fuera de las láminas de peptidoglicano de la pared celular (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), que constituyen un grupo bien definido dentro de las eubacterias (Woese, 1987). No obstante, la pared

celular también presenta características que la asemejan a las de bacterias Gram-positivas, como es el grosor de la capa de peptidoglicano (Hoiczky y Hansel, 2000). Las cianobacterias se caracterizan por llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, proceso en el que se produce la fotólisis del agua con liberación de oxígeno molecular, lo que las distingue de las llamadas bacterias fotosintéticas, que realizan distintos tipos de fotosíntesis anoxigénica. El aparato fotosintético de las cianobacterias es muy similar en funcionamiento y estructura al de los cloroplastos de las algas y las plantas, de los que representa el precursor evolutivo (DeRuyter y Fromme, 2008). Por otra parte, las cianobacterias se diferencian de la mayoría de los eucariotas fotosintéticos por la presencia en su aparato fotosintético de unos pigmentos antena especiales denominados de forma genérica ficobiliproteínas (Tandeau de Marsac, 2003).

Las cianobacterias han tenido un papel muy importante en el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que fueron los primeros organismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, jugando un papel fundamental en el desarrollo de la atmósfera actual y en la evolución de la vida en nuestro planeta (Buick, 1992; Falkowski *et al.*, 2005; Mulkidjanian *et al.*, 2006). Los primeros fósiles atribuidos a cianobacterias se habían encontrado en rocas sedimentarias generadas hace 3.500 Ma (Schopf y Walter, 1982; Schopf y Packer, 1987), pero en la actualidad se ha propuesto que las cianobacterias pudieron aparecer hace 3.000-2.700 Ma (Brocks *et al.*, 1999; Knoll, 2008), llegando a ser importantes como productores primarios hace 2.450-2.320 Ma, cuando tuvo lugar la Revolución o Crisis del Oxígeno (Hayes y Waldbauer, 2006; Knoll, 2008). Sin embargo, en la literatura más reciente se ha propuesto que las primeras cianobacterias pudieron surgir poco antes de la Revolución o Crisis del Oxígeno (Kopp *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2008). En cuanto a la importancia evolutiva de las cianobacterias, hay que mencionar que las similitudes de estructura y funcionamiento, además de la homología de las secuencias de rRNA 16S y de algunos genes relacionados con la fotosíntesis, han permitido establecer una relación filogenética entre las cianobacterias, las proclorofitas, los cloroplastos de plantas y algas eucariotas y el orgánulo fotosintético de *Cyanophora paradoxa* (Giovannoni *et al.*, 1988; Giovannoni *et al.*, 1992; Löffelhardt y Bohnert, 1994), lo que apoya el origen endosimbiótico del cloroplasto a partir de un organismo de tipo cianobacteriano (Gray, 1989). Cianobacterias de vida intracelular obligatoria, como la presente en la ameba *Paulinella chromatophora*, podrían representar asimismo nuevos orgánulos en evolución (Bodyl *et al.*, 2007).

Las cianobacterias están presentes en una gran variedad de nichos ecológicos, incluyendo océanos, aguas continentales y suelos, encontrándose en ambientes extremos como las regiones árticas, aguas termales y desiertos. Asimismo, algunas estirpes pueden establecer simbiosis con hongos, plantas, esponjas o protistas (Adams, 2000; Meeks y Elhai, 2002). Esta gran capacidad de adaptación podría deberse al desarrollo de sistemas de regulación específicos (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993).

Actualmente, el papel que juegan en los ciclos del carbono y el nitrógeno hace que las cianobacterias tengan una gran relevancia en la producción primaria de los océanos, constituyendo un grupo de organismos muy importante en el mantenimiento del equilibrio de la Biosfera (Bergman *et al.*, 1997). Además, estos organismos tienen un gran potencial en biotecnología, siendo especialmente relevante su capacidad de producción de polisacáridos, ficobiliproteínas, carotenoides e hidrógeno.

A pesar de su coherencia filogenética, las cianobacterias constituyen un grupo morfológicamente muy diverso, que incluye estirpes unicelulares y filamentosas (Figura 1.11). Destaca, además, la capacidad de diferenciación celular de estos organismos. Así, algunas estirpes de cianobacterias filamentosas son capaces de desarrollar células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (heterocistos; Figura 1.11B, E) y, en algunos casos, también células de resistencia (aquinetos; Figura 1.11B). Algunas estirpes de cianobacterias filamentosas, formadoras o no de heterocistos, pueden diferenciar además pequeños filamentos móviles (hormogonios; Figura 1.11C), distinguibles de los

filamentos vegetativos, que están implicados en la dispersión de la especie en sus hábitats naturales (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Wolk, 1980; Damerval *et al.*, 1991; Tandeau de Marsac, 1994).

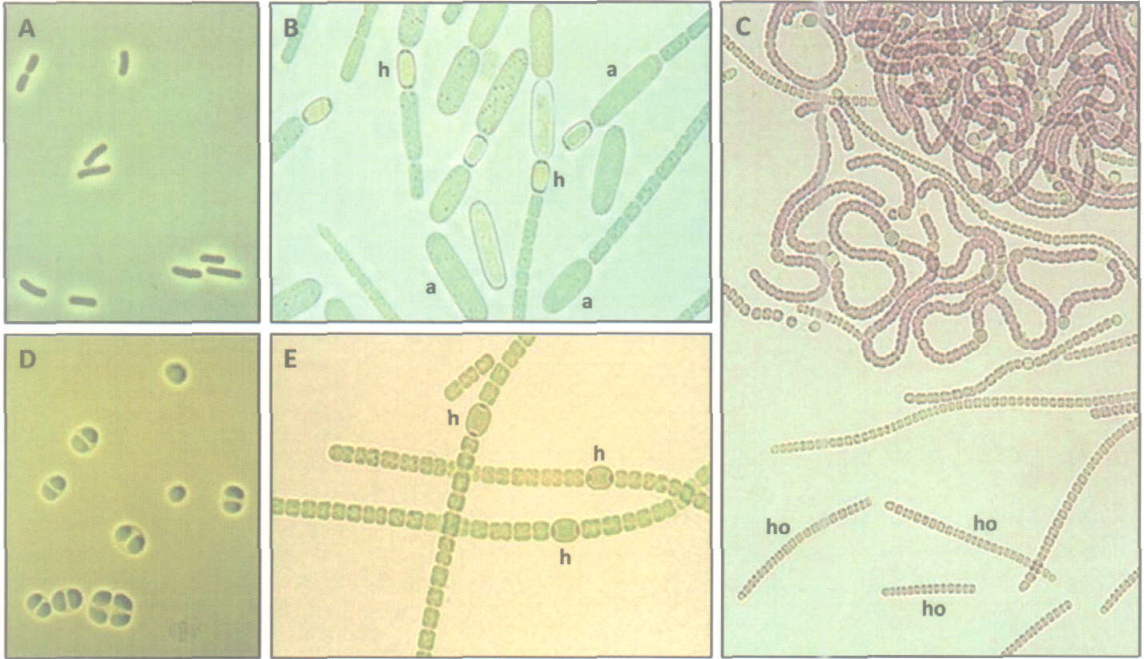


Figura 1.11. Diversidad morfológica y diferenciación celular en las cianobacterias. A, *Synechococcus* sp. PCC 9321 (imagen cortesía de A. M. Muro-Pastor). B, filamentos de *Anabaena cylindrica* ATCC 29414. C, *Nostoc* sp. PCC 9203. D, estirpe PCC 9317 (género sin asignar) (imagen cortesía de A. M. Muro-Pastor). E, estirpe 9v, aislada en Mkindo (Tanzania). En las fotos se señalan los heterocistos (h), aquinetos (a) y hormogonios (ho). Las fotos B, C y E han sido tomadas de Herrero *et al.* (2004).

Tradicionalmente, las cianobacterias se han clasificado en cinco grupos taxonómicos basados principalmente en criterios morfológicos y de división celular (Rippka *et al.*, 1979). La sección I (Chroococcales) incluye estirpes unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación; a esta sección pertenecen los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis*. La sección II (Pleurocapsales) está formada por estirpes unicelulares que se dividen mediante fisión múltiple o por fisión binaria y múltiple, como las del género *Dermocarpa*. La sección III (Oscillatoriales) agrupa a las estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, como las del género *Pseudanabaena*. La sección IV (Nostocales) está constituida por estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en un solo plano, por lo que los filamentos no presentan ramificaciones verdaderas; los géneros *Anabaena* y *Nostoc* pertenecen a esta sección. Finalmente, en la sección V (Stigonematales) se agrupan las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en más de un plano dando lugar a filamentos ramificados, como las del género *Fischerella*. Sin embargo, los estudios filogenéticos de las cianobacterias basados en la comparación de secuencias de rRNA 16S y en análisis moleculares (Giovannoni *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1999; Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005; Tomitani *et al.*, 2006) apoyan sólo en parte esta clasificación. Sólo aquellos grupos que comparten características como la fisión múltiple (Sección II) o la diferenciación celular (Secciones IV y V conjuntamente) son filogenéticamente coherentes, mientras que las secciones I y III agrupan morfotipos con diferentes posiciones filogenéticas (Giovannoni *et al.*, 1988). La Figura 1.12, tomada de Knoll (2008), ilustra las relaciones filogenéticas entre las cianobacterias, establecidas a partir de análisis moleculares. Se ha especulado que el ancestro común de las cianobacterias fue unicelular y fotoautótrofo, que vivió en ambientes terrestres o de agua dulce y que no tenía la capacidad de fijar nitrógeno (Sánchez-Baracaldo *et al.*, 2005). Los diferentes estudios filogenéticos indican que las estirpes filamentosas con capacidad de

diferenciar células especializadas (heterocistos y aquinetos) aparecieron hace 2.450-2.100 Ma (Tomitani *et al.*, 2006), habiéndose encontrado pruebas micropaleontológicas en rocas de hace 1.900 Ma (Hofmann, 1976).

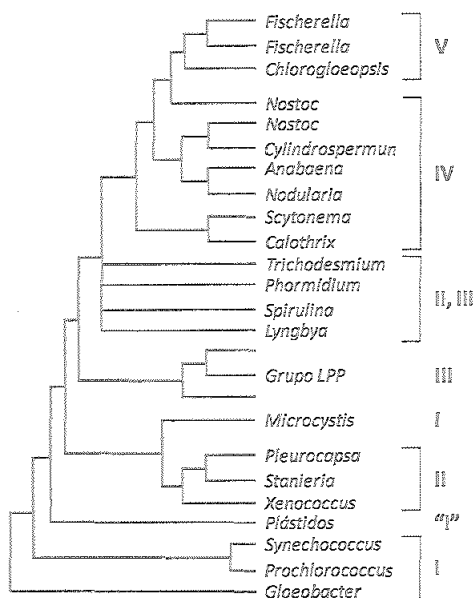


Figura 1.12. Relaciones filogenéticas entre las cianobacterias. Comparación de secuencias moleculares, particularmente de las descritas en Sánchez-Baracaldo *et al.* (2005) y Tomitani *et al.* (2006). Los números romanos hacen referencia a la clasificación taxonómica de Rippka *et al.* (1979). Figura modificada de Knoll (2008).

La heterogeneidad de este grupo de microorganismos también se manifiesta en el amplio rango de contenido de G+C de su DNA, entre el 32 y el 71% (Herdman *et al.*, 1979b, a), cercano al rango de valores encontrado en procariontes en general, y su genoma puede alcanzar el tamaño del de cualquier otro grupo bacteriano (1,5-10 Mb).

Contrastando con su diversidad morfológica, las cianobacterias constituyen un grupo muy homogéneo desde el punto de vista metabólico. Con una excepción (Zehr *et al.*, 2008), todas las estirpes conocidas son fotoautótrofas aerobias, y muchas son fotoautótrofas obligadas, para lo cual sólo requieren unos pocos nutrientes. En general, pueden llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica y sólo algunas, como *Oscillatoria limnetica*, en determinadas condiciones, una fotosíntesis anoxigénica oxidando H_2S y liberando S. Su metabolismo está centrado en la ruta de las pentosas fosfato, tanto para la asimilación fotosintética del CO_2 (vía reductiva o ciclo de Calvin) como para el metabolismo respiratorio en oscuridad (vía oxidativa). Dado que carecen de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Pearce *et al.*, 1969; Stanier y Cohen-Bazire, 1977), la ruta del ciclo de Krebs tiene una función solamente anabólica, suministrando el 2-oxoglutarato necesario para la incorporación de nitrógeno inorgánico en esqueletos carbonados, la síntesis de aminoácidos de la familia del glutamato y la síntesis de δ -aminolevulinato, que es el precursor inmediato para la biosíntesis de porfirinas, ficobilinas y clorofila (Beale, 1994). Parte del CO_2 fijado se acumula en forma de glucógeno como material de reserva que se utiliza en los períodos de oscuridad, cuando no se realiza la fotosíntesis. En la oscuridad, las cianobacterias muestran un metabolismo respiratorio en el que la cadena de transporte de electrones comparte algunos de sus componentes con la cadena de transporte de electrones fotosintética (Schmetterer, 1994). Algunas cianobacterias también son capaces de asimilar determinados azúcares como la sacarosa, la glucosa o la fructosa, necesitando o no iluminación para ello, por lo que pueden clasificarse como fotoheterótrofas o heterótrofas facultativas, respectivamente. Esta capacidad

depende, al menos en parte, de la existencia de la permeasa correspondiente que facilite la entrada del azúcar en la célula.

En el aparato fotosintético cianobacteriano, una fracción importante de la captación de la luz tiene lugar en los ficobilisomas, estructuras supramoleculares constituidas por pigmentos antena (ficobiliproteínas) que interactúan con la membrana tilacoidal. A diferencia de las plantas, las cianobacterias carecen en general de clorofila *b* (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Las ficobiliproteínas, que transfieren la energía principalmente al fotosistema II, constituyen hasta el 50% de la proteína celular total, pudiendo servir de reserva de nitrógeno y carbono (Allen, 1984).

La cianobacteria en la que se ha centrado este trabajo es la estirpe filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120 (Figura 1.13), perteneciente a la sección IV de la clasificación de Rippka *et al.* (1979).

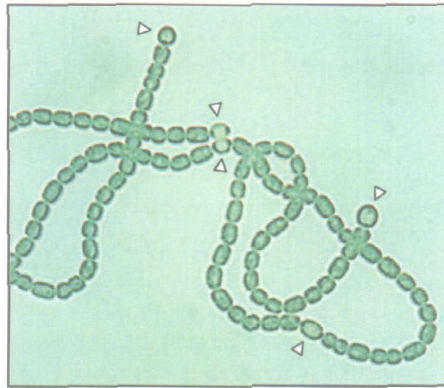


Figura 1.13. *Anabaena* sp. PCC 7120. Fotografía tomada mediante microscopía óptica de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivada en condiciones diazotróficas. Se observan varios heterocistos (señalados con triángulos blancos), distribuidos a lo largo de los filamentos, que presentan gránulos polares.

1.3.2. Asimilación de nitrógeno en las cianobacterias.

El nitrógeno constituye uno de los bioelementos cuantitativa y cualitativamente más importantes, y se incorpora a la Biosfera mediante distintos procesos asimilatorios llevados a cabo por microorganismos y plantas. Las cianobacterias pueden utilizar como fuente de nitrógeno para su crecimiento sustancias como el nitrato, el nitrito y la urea. La asimilación de estas sustancias exige su incorporación al interior celular y su posterior metabolización para generar amonio, que es el compuesto nitrogenado inorgánico que se combina con esqueletos carbonados dando lugar a compuestos orgánicos nitrogenados (Figura 1.14). Las cianobacterias también pueden incorporar directamente el amonio que pueda encontrarse en el medio extracelular. Asimismo, algunas cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico o utilizar algunos aminoácidos, como la glutamina o la arginina, para cubrir sus necesidades metabólicas (Flores y Herrero, 1994). Existe una jerarquía en la utilización de las distintas fuentes de nitrógeno, de manera que se usan preferentemente aquellas cuya asimilación requiere menor consumo de energía, siendo el amonio la fuente de nitrógeno utilizada preferentemente por las cianobacterias (Herrero *et al.*, 2001).

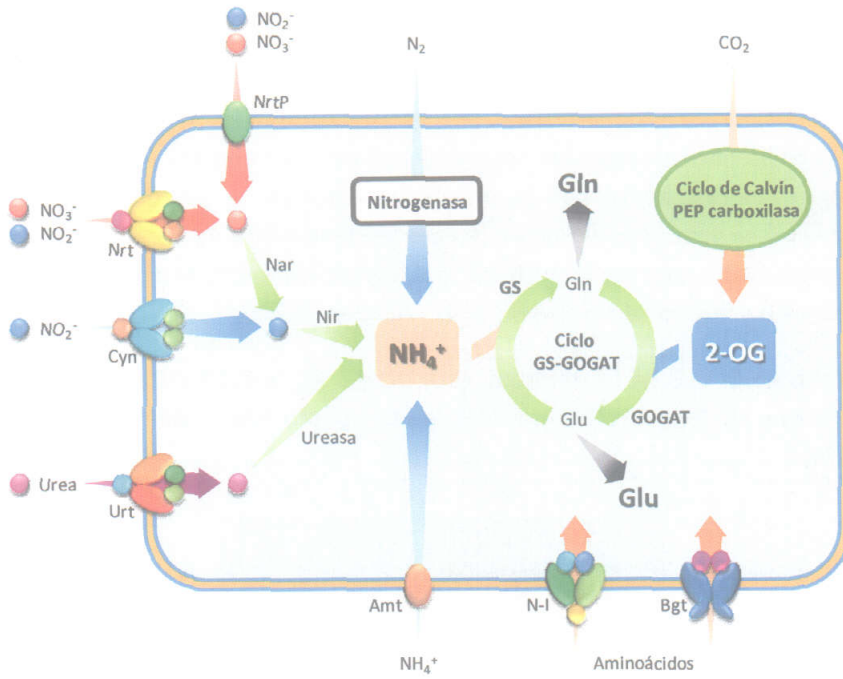


Figura 1.14. Vías principales de asimilación de nitrógeno en cianobacterias. Las fuentes de nitrógeno combinado se incorporan en la célula a través de permeasas y son metabolizadas para generar amonio, el cual se incorpora a esqueletos carbonados por medio del ciclo glutamina sintetasa–glutamato sintasa (GS-GOGAT). El nitrógeno es distribuido, entonces, desde los aminoácidos Gln y Glu a otros compuestos orgánicos con nitrógeno. NrtP, transportador monocomponente de nitrato/nitrito; Nrt, transportador de tipo ABC de nitrato/nitrito; Cyn, transportador de tipo ABC de cianato/nitrito; Urt, transportador de tipo ABC de urea; Amt, permeasa de amonio; N-I, transportador de tipo ABC de aminoácidos neutros e hidrofóbicos; Bgt, transportador de tipo ABC de aminoácidos básicos; Nar, nitrato reductasa; Nir, nitrito reductasa; PEP carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2-OG, 2-oxoglutarato; GS, glutamina sintetasa; GOGAT, glutamato sintasa. La reacción catalizada por la ureasa libera dos moléculas de amonio y una molécula de CO_2 por molécula de urea metabolizada (no se indica). En *Anabaena* sp. PCC 7120 la nitrogenasa sólo está presente en los heterocistos, donde tiene lugar la fijación de N_2 . Figura adaptada de Flores y Herrero (2005).

1.3.2.1. Asimilación de nitrato y nitrito.

El nitrato es la fuente de nitrógeno predominante en muchos ecosistemas. De acuerdo con esto, la mayoría de las cianobacterias estudiadas tienen la capacidad de asimilar nitrato (revisado en Flores *et al.*, 2005), siendo las cianobacterias marinas del género *Prochlorococcus* las únicas que hasta la fecha parecen incapaces de asimilarlo.

La entrada de nitrato y nitrito al interior celular se produce mediante sistemas de transporte biespecíficos, capaces de transportar tanto nitrato como nitrito. En el caso del nitrito, adicionalmente puede existir una entrada en la célula mediante difusión del ácido nitroso, que es menos importante a medida que aumenta el pH del medio. Mientras que casi todas las cianobacterias, entre ellas *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Synechococcus* sp. PCC 7942, poseen un transportador activo de alta afinidad de tipo ABC denominado Nrt, determinado por los genes *nrtABCD*, la mayoría de las cianobacterias marinas, así como la formadora de heterocistos *Nostoc punctiforme*, una cianobacteria del suelo, poseen una permeasa de la superfamilia MFS, producto del gen *nrtP* (denominado *napA* por algunos autores) (Sakamoto *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2005; Aichi *et al.*, 2006). Adicionalmente a los transportadores biespecíficos anteriores, en *Synechococcus* sp. PCC 7942 se ha identificado un segundo sistema de transporte de alta afinidad de tipo ABC distinto del sistema Nrt, denominado por los genes *cynABD*. Este sistema es específico de cianato y nitrito (Maeda *et al.*, 1998; Maeda y Omata, 2009).

Una vez en el interior celular, el nitrato es reducido a nitrito por la nitrato reductasa, y éste a amonio por la nitrito reductasa. Ambas enzimas requieren ferredoxina o flavodoxina, reducida por el aparato fotosintético, como donador fisiológico de electrones (Flores y Herrero, 1994). Dichas enzimas están determinadas por los genes *narB* y *nirA* respectivamente, que en muchos casos se encuentran agrupados con los genes *nrtABCD* o *nrtP*, que determinan los transportadores, para constituir una unidad transcripcional denominada operón *nir* (Flores *et al.*, 2005).

1.3.2.2. Asimilación de amonio.

Debido a su carga, el amonio no puede atravesar las membranas biológicas, requiriendo para ello un sistema de transporte específico. Sin embargo, en disoluciones acuosas de amonio se establece un equilibrio entre este ión y el amoniaco (pK_a 9,25; Osakai *et al.*, 1987), el cual sí puede difundir fácilmente a través de las membranas biológicas (Kleiner, 1981). Así, a altas concentraciones de amonio, la difusión de amoniaco podría ser suficiente para cubrir las necesidades de nitrógeno del organismo. Sin embargo, en los ecosistemas acuáticos naturales, en los que el amonio puede encontrarse a concentraciones muy bajas, del orden de 1 μ M o inferiores, el transporte de amonio debe ser necesario para permitir una entrada apreciable de este nutriente en la célula. De hecho, en muchos organismos, los genes *amt*, que determinan los sistemas de transporte de amonio, están sujetos a regulación por nitrógeno, expresándose principalmente en condiciones de deficiencia de este elemento. Por ello, las proteínas Amt parecen ser necesarias para el crecimiento a expensas de concentraciones micromolares de amonio en el medio extracelular (Marini *et al.*, 1997; Soupene *et al.*, 1998), así como para la recuperación del amonio que las células pierden debido a la permeabilidad de las membranas celulares al amoniaco (Marini *et al.*, 1997; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c).

Dada la dificultad de trabajar con amonio marcado radiactivamente en el átomo de nitrógeno, para los estudios de los transportadores de dicho sustrato se ha empleado tradicionalmente un análogo estructural del mismo, el metilamonio, marcado con 14 C (revisado en Muro-Pastor *et al.*, 2005). Entre las cianobacterias estudiadas se encuentran las unicelulares *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Montesinos *et al.*, 1998) y *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Boussiba *et al.*, 1984; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c; Paz-Yepes *et al.*, 2007) y las formadoras de heterocistos *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Anabaena azollae* y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Rai *et al.*, 1984; Paz-Yepes *et al.*, 2008). El transporte de metilamonio es concentrativo y su acumulación en el interior celular se afecta por inhibidores metabólicos y parece depender del potencial de membrana (Boussiba *et al.*, 1984; Rai *et al.*, 1984; Montesinos *et al.*, 1998). Se han descrito dos fases para la incorporación de metilamonio: una primera rápida que refleja el transporte al interior celular, seguida de otra más lenta que refleja la incorporación de metilamonio en γ -metilglutamina por la acción de la glutamina sintetasa (Boussiba *et al.*, 1984; Montesinos *et al.*, 1998; Paz-Yepes *et al.*, 2007). Asimismo, la actividad de transporte de metilamonio se inhibe por amonio (Boussiba y Gibson, 1987; Vega-Palas *et al.*, 1990; Montesinos *et al.*, 1998) aunque, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, en cianobacterias no se ha descrito una regulación mediada por la proteína P_{II} (Coutts *et al.*, 2002).

En el cromosoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han identificado tres genes (*amt1*, *amt2* y *amt3*) que determinan transportadores de amonio y metilamonio (véase el apartado 1.1.3; Montesinos *et al.*, 1998). La proteína Amt1 es la responsable de más del 95% de la actividad de transporte de [14 C]metilamonio suministrado a concentraciones micromolares (Montesinos *et al.*, 1998). Los tres genes se expresan preferentemente en condiciones de deficiencia de nitrógeno, siendo *amt1* el que exhibe niveles de expresión más altos (Montesinos *et al.*, 1998). Como se ha mencionado más arriba, esto es consistente con un papel de estas permeasas en el transporte de amonio cuando éste se encuentra a concentraciones muy bajas en los hábitats naturales. Por otra parte, en *Synechococcus* sp.

PCC 7942 se han identificado dos genes *amt*, denominados *amt1* y *amtB*. A diferencia del producto del gen *amt1*, que muestra un 59% de identidades con la proteína Amt1 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c), *amtB* determina una proteína que se agrupa filogenéticamente con las proteínas AmtB bacterianas, razón por la que se le ha designado con este nombre (Paz-Yepes *et al.*, 2007). En *Synechococcus* sp. PCC 7942, la proteína Amt1 es responsable del 98% de la actividad de transporte de metilamonio cuando éste se suministra a concentraciones bajas, siendo necesaria para el crecimiento a expensas de amonio a concentraciones micromolares y para la recuperación del amonio perdido de las células (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002c). Por su parte, la expresión del gen *amtB* está sometida a regulación por nitrógeno, al igual que la de *amt1*, aunque sus niveles de expresión son muy inferiores a los de este último (Paz-Yepes *et al.*, 2007). AmtB se requiere para que se alcancen niveles máximos de incorporación de metilamonio y para un correcto crecimiento con bajas concentraciones de amonio, habiéndose sugerido que, junto con Amt1, podría formar los complejos triméricos heterólogos que tendrían la máxima actividad de transporte (Paz-Yepes *et al.*, 2007). Respecto a las cianobacterias filamentosas, en *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha identificado un agrupamiento de tres genes, denominados *amt4*, *amt1* y *amtB*, que determinan permeasas de amonio/metilamonio. En este caso, los niveles de expresión de *amt4*, y especialmente de *amt1*, son muy superiores a los de *amtB*, y la expresión de los tres genes también se modula en función del régimen de nitrógeno (Paz-Yepes *et al.*, 2008).

1.3.2.3. Asimilación de nitrógeno orgánico.

Algunas cianobacterias son capaces de utilizar como fuente de nitrógeno compuestos orgánicos nitrogenados, entre los que destacan la urea y algunos aminoácidos. Se desconoce la importancia de algunas de estas fuentes de nitrógeno para el crecimiento de las poblaciones cianobacterianas en la naturaleza, pero podrían considerarse relevantes en el caso de las especies de *Prochlorococcus* que son incapaces de asimilar nitrato o nitrito. De hecho, se han publicado resultados que muestran que en aguas marinas oligotróficas *Prochlorococcus* presenta tasas de incorporación de nitrógeno orgánico superiores a las de *Synechococcus* (Zubkov *et al.*, 2003).

1.3.2.3.1. Asimilación de urea.

La urea es una buena fuente de nitrógeno para muchas cianobacterias y su presencia en algunos hábitats naturales de estos organismos (0,1-5 μM en los océanos) la convierten en una fuente de nitrógeno de importancia cuantitativa similar a la del nitrato o el amonio (Antia *et al.*, 1991; Flores y Herrero, 1994). La urea puede difundir a través de las membranas biológicas cuando se encuentra a concentraciones superiores a 1 μM en el medio extracelular. Sin embargo, algunas cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 o *Anabaena* sp. PCC 7120 son capaces de incorporar urea del medio extracelular mediante un sistema de transporte activo de alta afinidad, que en *Anabaena* sp. PCC 7120 exhibe una K_s de 0,1 μM (Valladares *et al.*, 2002). En esta cianobacteria se ha descrito el transportador Urt, que es un sistema de transporte de tipo ABC determinado por los genes *urtABCDE*, que forman un operón (Valladares *et al.*, 2002). Una vez en el interior celular, la urea es metabolizada por la acción de la enzima ureasa, también denominada urea amidohidrolasa, generando CO_2 y dos moléculas de NH_4^+ (Mobley *et al.*, 1995). En cianobacterias, la ureasa es citoplasmática y está constituida por una subunidad grande (α o UreC) y dos pequeñas (γ o UreA y β o UreB) que conforman un heterotrímero (Collifer *et al.*, 1999; Palinska *et al.*, 2000). Los genes *ure* se expresan constitutivamente con respecto a la fuente de nitrógeno, mientras que la expresión de los genes *urt* está controlada por nitrógeno, induciéndose en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado (Valladares *et al.*, 2002).

1.3.2.3.2. Asimilación de aminoácidos.

La utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno requiere la existencia de una vía efectiva de entrada de dichos compuestos a la célula y de las enzimas capaces de metabolizarlos. A diferencia de lo que ocurre en otras eubacterias que poseen sistemas de transporte de aminoácidos muy específicos, e incluso sistemas con funciones redundantes, las cianobacterias parecen tener un menor número de permeasas para el transporte de aminoácidos y con menor especificidad de sustrato (Montesinos *et al.*, 1995, 1997; Quintero *et al.*, 2001).

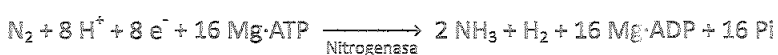
Para diferentes cianobacterias se han descrito distintas posibilidades en cuanto a la capacidad de incorporación de aminoácidos, tanto en lo que se refiere al rango de los aminoácidos que cada una puede transportar como a la eficiencia en la captura de cada aminoácido (Montesinos *et al.*, 1997). Así, por ejemplo, aunque todas las cianobacterias estudiadas parecen tener al menos un sistema de transporte de aminoácidos neutros, su especificidad varía en función de la estirpe considerada (Montesinos *et al.*, 1997).

Se ha descrito la capacidad de una serie de cianobacterias de crecer con aminoácidos como única fuente de nitrógeno, como son *Synechococcus* sp. PCC 6301, con glutamina; *Synechocystis* sp. PCC 6714, con Gln, Asn o Arg; *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, con Asn o Arg, y *Anabaena* sp. PCC 7118, con Gln, Arg u Orn (Neilson y Larsson, 1980). Igualmente, se ha descrito que *Anabaena* sp. PCC 7120 puede crecer con arginina como única fuente de nitrógeno (Herrero y Flores, 1990), así como que *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede crecer con arginina a la misma velocidad que con nitrato (Flores y Muro-Pastor, 1990). En este sentido, estudios más detallados con *Synechocystis* sp. PCC 6803 han permitido describir la ruta de catabolismo de arginina, que combina la vía de la arginasa y el ciclo de la urea y explica la capacidad de esta cianobacteria de vivir a expensas de este aminoácido, ya que esta ruta produce urea y glutamato. Relacionados con esta ruta se encuentran otros aminoácidos que pueden servir como fuente de nitrógeno a las cianobacterias, como son Asp, Orn, Pro y Glu, además de Glu, que sirve de sillar para la síntesis de varios aminoácidos (Quintero *et al.*, 2000). La prolina, por su parte, puede entrar en las células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 a través del sistema de transporte de aminoácidos neutros, siendo posteriormente metabolizada por la prolina oxidasa con la concomitante producción de glutamato (Quintero, 2000; Picossi, 2003).

En relación con la asimilación de aminoácidos, hay que mencionar la formación en muchas cianobacterias de cianoficina (multi-L-arginil-poli-L-aspartato), un polímero de almacenamiento compuesto por cantidades equimoleculares de Asp y Arg que se sintetiza extrarrribosómicamente. Este polímero se acumula en forma de gránulos en el citoplasma de las células, principalmente en condiciones de crecimiento desfavorables pero con suficiente nitrógeno (Simon, 1987). Hasta hace poco se pensaba que la cianoficina era exclusiva de las cianobacterias, pero recientemente se ha descrito su presencia en algunas otras bacterias (Krehenbrink *et al.*, 2002; Ziegler *et al.*, 2002).

1.3.2.4. Asimilación de dinitrógeno.

La capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico está presente en cianobacterias de todas las secciones taxonómicas (Flores y Herrero, 1994). El proceso consiste en la reducción de una molécula de dinitrógeno (N_2) a dos moléculas de amoníaco (NH_3), según la siguiente reacción catalizada por el complejo nitrogenasa:



Esta reducción es un proceso energéticamente muy costoso que supone un consumo de 16 moléculas de ATP y 8 electrones por cada molécula de dinitrógeno que se fija (Figura 1.15).

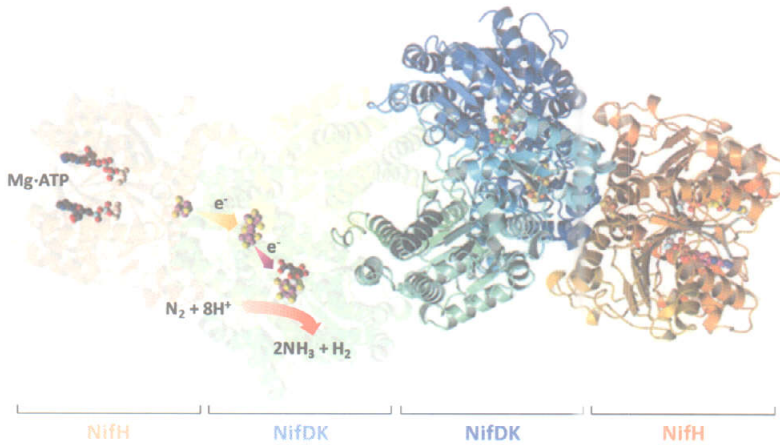


Figura 1.15. Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa de molibdeno. La reacción catalizada por la nitrogenasa produce amonio e hidrógeno a expensas de ATP. En la parte izquierda del complejo simétrico de la nitrogenasa se indican las posiciones relativas de las moléculas de Mg-ATP y de los centros [Fe-S], así como la ruta de transferencia de electrones hacia el sitio activo. El componente NifH se muestra en naranja y el componente NifDK en azul y verde. Figura modificada de Rubio y Ludden (2008).

Aunque podría haber una excepción en *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe *et al.*, 1997), el complejo nitrogenasa es homólogo en todas las bacterias capaces de llevar a cabo la fijación de N₂ y está formado por dos componentes proteicos denominados dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa (Georgiadis *et al.*, 1992; Kim y Rees, 1992). La dinitrogenasa contiene Fe y Mo y es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos β , determinadas por los genes *nifD* y *nifK* respectivamente, que contiene un centro P [Fe₈-S₇] (del inglés *P-cluster*) y un cofactor de Fe-Mo por cada dímero $\alpha\beta$ (Figura 1.15) (Rubio y Ludden, 2005, 2008). La dinitrogenasa reductasa, por su parte, es un dímero compuesto por dos subunidades idénticas, determinadas por el gen *nifH*, con un centro [Fe₄-S₄], que media la transferencia, dependiente de ATP, de electrones procedentes de donadores como la ferredoxina o la flavodoxina al centro P de cada dímero $\alpha\beta$ de la dinitrogenasa, la cual une N₂ mediante el cofactor de Fe-Mo y cataliza su reducción a NH₃ (Figura 1.15) (Rubio y Ludden, 2005, 2008). Esta reducción va acompañada de una reducción concomitante de protones a H₂ catalizada por el mismo complejo enzimático (Fay, 1992), lo cual supone para la célula un gasto de energía y poder reductor que disminuye la eficiencia del proceso de fijación de N₂. Esta energía y poder reductor consumidos se pueden recuperar parcialmente por la acción de la enzima hidrogenasa, determinada por los genes *hupL* y *hupS* (Tamagnini *et al.*, 2002), que cataliza la siguiente reacción:



Los electrones resultantes de esta reacción se dirigen a las cadenas de transporte de electrones respiratoria y fotosintética, permitiendo regenerar ATP y poder reductor, además de ayudar a mantener los niveles microóxicos del heterocisto mediante la reducción de oxígeno asociada a la respiración (Houchins, 1984; Spiller y Shanmugam, 1987).

El primer organismo diazotrófico en el que se estudiaron los genes *nif* de fijación de N₂ fue *Klebsiella pneumoniae*, que posee un agrupamiento génico con 20 genes *nif*, *nifJHDKTYENXUSVWZMFLABQ*, que está organizado en varias unidades transcripcionales. Sin embargo, este agrupamiento génico es más simple en *K. pneumoniae* que en otros organismos modelo utilizados para estudiar la fijación de N₂,

como *Azotobacter vinelandii* (Rubio y Ludden, 2008). En cianobacterias, además de los genes estructurales de la nitrogenasa, *nifH*, *nifD* y *nifK*, que se han caracterizado en diversas estirpes, en algunas se han identificado otros genes necesarios para el proceso de fijación de nitrógeno (Flores y Herrero, 1994). En *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Synechococcus* sp. RF-1 se han caracterizado 15 genes que están localizados en un solo agrupamiento y organizados en 6 unidades transcripcionales: *nifB-fdxN-nifS-nifU*, *nifHDK*, *nifEN*, *nifX-orf2*, *nifW-hesA-hesB* y *fdxH* (Haselkorn y Bulkema, 1992; Huang *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2001). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han encontrado además, en otras posiciones del cromosoma, los genes *nifV*, *nifZ* y *nifT* (Böhme, 1998).

Dado que el complejo enzimático de la nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, el cual lo inactiva rápida e irreversiblemente, las cianobacterias han desarrollado distintos mecanismos o estrategias para proteger la maquinaria de fijación de nitrógeno no sólo frente al oxígeno atmosférico, sino también frente al que se genera intracelularmente como resultado de la fotosíntesis oxigénica. Estos mecanismos van desde llevar a cabo la fijación sólo en ambientes anóxicos o microóxicos, hasta la separación temporal o espacial de los procesos de fijación de nitrógeno y fotosíntesis oxigénica (Gallon, 1981; Fay, 1992; Gallon, 1992; Flores y Herrero, 1994). La estrategia más común en las cianobacterias no formadoras de heterocistos es la separación temporal de los dos procesos (Stewart y Lex, 1970; Huang *et al.*, 1999; Reade *et al.*, 1999; Misra y Tuli, 2000), expresando la actividad nitrogenasa cuando están en oscuridad y realizando la fotosíntesis oxigénica cuando se exponen a la luz (Fay, 1992). En el caso de algunas cianobacterias filamentosas, como las de los géneros *Nostoc* o *Anabaena*, la separación espacial de estos dos procesos incompatibles se lleva a cabo mediante el desarrollo, a partir de algunas células vegetativas, de heterocistos, células especializadas en la fijación de nitrógeno que presentan una estructura y fisiología específicas para la creación y el mantenimiento de un ambiente microóxico adecuado para el funcionamiento de la nitrogenasa (véase el apartado 1.3.3). El desarrollo de los heterocistos puede haber representado una solución ancestral al cambio que supuso la aparición de una atmósfera óxica como producto de la fotosíntesis cianobacteriana (Tomitani *et al.*, 2006). Por otra parte, algunas cianobacterias como *Trichodesmium* sp. emplean sistemas de protección hasta ahora desconocidos para realizar simultáneamente ambos procesos, ya que fijan dinitrógeno aeróbicamente en periodos de iluminación pero no desarrollan heterocistos (Fay, 1992; Flores y Herrero, 1994; Bergman *et al.*, 1997; Stal y Zehr, 2008).

1.3.2.5. Incorporación de amonio a esqueletos carbonados.

En las cianobacterias se dan varias reacciones por las que el amonio podría ser incorporado a esqueletos carbonados. Las enzimas que catalizan estas reacciones son la glutamina sintetasa (GS), la glicina sintasa y algunas deshidrogenasas de aminoácidos como la alanina deshidrogenasa (AlaDH), la aspartato deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Luque y Forchhammer, 2008). De todas estas reacciones, tres se consideran importantes para asimilar amonio, la de la alanina deshidrogenasa, que cataliza la aminación reductiva de piruvato generando Ala (Rowell y Stewart, 1975; Meeks *et al.*, 1978), la de la glutamato deshidrogenasa (Meeks *et al.*, 1978), que cataliza la aminación reductiva de 2-OG generando Glu, y el ciclo de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa (GOGAT), que da lugar, por la acción secuencial de ambas enzimas, a una molécula de Glu neto por molécula de amonio asimilada (Thomas *et al.*, 1977). Sin embargo, en las cianobacterias, tanto el amonio resultante de la fijación de N₂ como el procedente del medio externo o de la reducción de nitrato se incorpora a esqueletos carbonados principalmente a través del ciclo GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1978; Herrero *et al.*, 2001), el cual constituye la conexión entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno. En este ciclo, el primer paso lo realiza la enzima GS, que cataliza la amidación dependiente de ATP de una molécula de glutamato para formar una molécula de glutamina, mientras que el segundo lo

lleva a cabo la enzima GOGAT, que cataliza la transferencia del grupo amido de una molécula de Gln a una molécula de 2-OG consumiendo poder reductor y produciendo dos moléculas de Glu. Una de las dos moléculas de glutamato producidas se recicla para la síntesis de glutamina (Flores y Herrero, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 2005).

En cianobacterias se han encontrado dos tipos de proteína GS, las de tipo I y III. La mayoría de las estirpes de cianobacterias, entre ellas *Anabaena* sp. PCC 7120, tienen sólo una, que es de tipo I (típica de eubacterias) y está determinada por el gen *glnA*. Algunas estirpes cianobacterianas no diazotróficas, como *Synechocystis* sp. PCC 6803, presentan además una GS de tipo III determinada por el gen *glnN*, que es homóloga a las encontradas en las familias *Bacteroidaceae* y *Butyrivibrio* y que presenta poca similitud con las GS de tipo I (Reyes y Florencio, 1994). Un caso especial lo constituye la cianobacteria *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, que parece presentar únicamente una GS de tipo III (Crespo *et al.*, 1998).

La GS de tipo I está sujeta a una fuerte regulación a nivel de expresión y actividad en función del tipo celular y de la disponibilidad de nitrógeno, siendo la expresión del gen *glnA* superior en condiciones de crecimiento sin amonio (con nitrato o dinitrógeno) que con amonio y, en cianobacterias formadoras de heterocistos, en los heterocistos que en las células vegetativas (Tumer *et al.*, 1983; Mérida *et al.*, 1991; Flores y Herrero, 1994; Reyes *et al.*, 1997; Martín-Figueroa *et al.*, 2000). Por su parte, a excepción de lo que ocurre en *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, la GS de tipo III no es esencial y su expresión tiene lugar en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Reyes *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 1998). En *Synechocystis* sp. PCC 6803 la actividad glutamina sintetasa también se regula negativamente por amonio a través de modificaciones postraduccionales de la proteína (Mérida *et al.*, 1991; García-Domínguez *et al.*, 1999). Estas modificaciones se producen mediante la unión de dos polipéptidos inhibidores, IF7 e IF17, los cuales interactúan con la GS en presencia de amonio provocando la completa inactivación de la enzima (Muro-Pastor *et al.*, 2003). Asimismo, los niveles celulares de IF7 e IF17 se regulan en función de la disponibilidad de amonio en el medio (García-Domínguez *et al.*, 1999, 2000; Galmozzi *et al.*, 2007).

A diferencia de lo que ocurre con la GS, la enzima GOGAT muestra una expresión constitutiva en cianobacterias, no estando regulada por la fuente de nitrógeno (Thomas *et al.*, 1977). Sin embargo, no se expresa en los heterocistos (Martín-Figueroa *et al.*, 2000). A diferencia de la GOGAT de bacterias heterotróficas, la enzima cianobacteriana depende de ferredoxina reducida como donador de electrones, al igual que sucede en plantas (Luque y Forchhammer, 2008). En muchas cianobacterias, entre ellas *Anabaena* sp. PCC 7120 (Martín-Figueroa *et al.*, 2000) y *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Marqués *et al.*, 1992), esta enzima, que está determinada por el gen *glsF*, se ha descrito como única GOGAT. En cambio, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Plectonema boryanum* se han encontrado dos enzimas GOGAT, una dependiente de ferredoxina y otra dependiente de NAD(P)H. En el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 la GOGAT dependiente de ferredoxina viene determinada por el gen *glsF*, y la dependiente de NAD(P)H por los genes *gltB* y *gltD*, que determinan una subunidad grande y otra pequeña, respectivamente (Navarro *et al.*, 1995; Okuhara *et al.*, 1999).

Por su parte, el 2-OG se sintetiza a partir de isocitrato con la reducción de NADP⁺ a NADPH, reacción que cataliza la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). Esta enzima se ha caracterizado en *Synechococcus* sp. PCC 6301, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Friga y Farkas, 1981; Muro-Pastor y Florencio, 1992, 1994). El gen *icaD*, que determina la IDH y es esencial en las estirpes anteriores, también se regula por nitrógeno, de manera que en el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 la expresión es más alta en condiciones de deficiencia de nitrógeno, y en *Anabaena* sp. PCC 7120 en condiciones de crecimiento diazotrófico (Muro-Pastor *et al.*, 1996).

Aunque en las cianobacterias la ruta GS-GOGAT representa la vía principal de asimilación de amonio, la alanina deshidrogenasa y la glutamato deshidrogenasa también pueden contribuir de manera significativa en algunas estirpes, habiéndose detectado en *Anabaena variabilis* producción de [^{13}N]Ala a partir de $^{13}\text{NH}_4^+$ cuando se inactiva la ruta GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). De hecho, la actividad AlaDH se ha detectado en muchas, aunque no todas, las cianobacterias estudiadas (Nelson y Doudoroff, 1973; Rowell y Stewart, 1975; revisado en Flores y Herrero, 1994). Por otra parte, la actividad GDH es muy baja, o incluso indetectable, en muchas cianobacterias (Hoare *et al.*, 1967; Nelson y Doudoroff, 1973). Sin embargo, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha detectado actividad GDH (Flores *et al.*, 1987; Chávez y Candau, 1991), habiéndose descrito que esta cianobacteria hace uso de ella en condiciones de crecimiento estacionario, además de suponer una ventaja para el crecimiento en presencia de amonio (Chávez *et al.*, 1999; Muro-Pastor *et al.*, 2005).

1.3.2.6. Regulación de la asimilación del nitrógeno en cianobacterias.

El control por nitrógeno es un fenómeno ampliamente observado en microorganismos y consiste en la represión de las vías de asimilación de algunas fuentes de nitrógeno cuando se encuentran disponibles otras más fácilmente asimilables (Merrick y Edwards, 1995). En la mayoría de las cianobacterias, la regulación de la asimilación de nitrógeno responde a la fuente de nitrógeno ambiental presente y a la disponibilidad de carbono inorgánico (CO_2 y HCO_3^-). El amonio es el nutriente nitrogenado preferido por ser energéticamente más económico para las células, y su disponibilidad en el medio determina la represión de muchos genes implicados en la asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas (Flores y Herrero, 1994; Herrero *et al.*, 2001). Como consecuencia, actividades como, por ejemplo, el transporte de nitrato, presentan niveles basales en presencia de amonio. Para que la regulación por amonio tenga lugar es necesaria la incorporación de éste a esqueletos carbonados mediante el ciclo GS-GOGAT (Stewart y Rowell, 1975; Herrero *et al.*, 1981), por lo que, más que la presencia de amonio extracelular, el indicador del estado nitrogenado celular debe ser un metabolito intracelular relacionado con dicho ciclo (Flores y Herrero, 1994). Concretamente, se ha identificado al 2-OG como la molécula señal que indica el estado nitrogenado o el balance C/N de la célula (Forchhammer, 1999; Muro-Pastor *et al.*, 2001; Forchhammer, 2004; Herrero *et al.*, 2004; Luque y Forchhammer, 2008), cuya síntesis depende de la fijación de CO_2 y su consumo de la operación del ciclo GS-GOGAT. Dado que en las cianobacterias el ciclo de Krebs está incompleto al carecer de la actividad 2-OG deshidrogenasa, la principal función del 2-OG es la de proporcionar el esqueleto carbonado para la asimilación de amonio mediante la vía GS-GOGAT (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Luque y Forchhammer, 2008). Así, en una situación de deficiencia de nitrógeno, cabe esperar que el 2-OG se acumule en el interior celular, lo cual se ha observado de hecho en cianobacterias unicelulares y filamentosas (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2005). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito que la acumulación de un análogo no metabolizable del 2-OG dispara el proceso de diferenciación de heterocistos, que normalmente requiere ausencia de nitrógeno combinado, incluso en presencia de amonio (Laurent *et al.*, 2005), lo que confirma la implicación del 2-OG, y no de metabolitos derivados del mismo, en la señalización del estado nitrogenado de la célula.

En cianobacterias, el control por nitrógeno está mediado por la proteína NtcA (del inglés *Nitrogen Control*), que es un regulador transcripcional perteneciente a la familia de los factores de transcripción de los que CRP o CAP (del inglés *cAMP Receptor Protein* o *Catabolite Activator Protein*, respectivamente) de *E. coli* es el ejemplo mejor conocido. El gen *ntcA* se clonó por primera vez de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Vega-Palas *et al.*, 1990), habiéndose comprobado posteriormente que es un gen muy conservado y de distribución universal en las cianobacterias (Frías *et al.*, 1993; Herrero *et al.*, 2001). NtcA lleva a cabo el control global del metabolismo del nitrógeno mediante la regulación de la expresión de

numerosos genes cuyos productos están implicados en las rutas de asimilación de nitrógeno (Herrero *et al.*, 2001), incluyendo el proceso de diferenciación del heterocisto. Entre los genes regulados están los del sistema de asimilación de nitrato, los de transporte de amonio/metilamonio y de urea, el gen *glnA*, el gen *icd* y muchos de los necesarios para el desarrollo y funcionamiento de los heterocistos, además del propio gen *ntcA*, que está sujeto a autorregulación positiva en numerosas cianobacterias (revisado en Herrero *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2004).

Al igual que otros reguladores de la familia CRP, NtcA posee en su región carboxilo terminal un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH, del Inglés *Helix-Turn-Helix*) de unión al DNA (Vega-Palas *et al.*, 1992), mediante el cual puede unirse específicamente a determinadas secuencias de DNA presentes en las regiones promotoras de los genes regulados (Herrero *et al.*, 2001). El motivo HTH está muy conservado entre las proteínas NtcA y, en consecuencia, también lo está la secuencia de DNA que reconoce (Herrero *et al.*, 2001; Luque y Forchhammer, 2008). Ésta está constituida por un palíndromo conteniendo la secuencia característica GTAN₆TAC, en la que los dos nucleótidos externos de cada triplete son los más importantes (Luque *et al.*, 1994; Ramasubramanian *et al.*, 1994; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). NtcA parece actuar como un homodímero, reconociendo cada subunidad un hemipalíndromo del sitio de unión al DNA (Luque *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2001; Wisén *et al.*, 2004). La estructura del promotor canónico activado por NtcA posee una caja -10, normalmente separada 5-7 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción, cuya secuencia consenso (TAN₃T) es muy similar a la descrita para los promotores de *E. coli* dependientes del factor σ^{70} , y un sitio de reconocimiento de NtcA con la secuencia GTAN₆TAC situada unos 22-23 nucleótidos por delante de la caja -10 (Herrero *et al.*, 2001). Esta estructura se ajusta a la de los promotores bacterianos regulados de clase II, en los que el activador se une en torno a la posición -41,5 respecto al sitio de inicio de la transcripción, solapando y reemplazando a la región -35 de interacción con el complejo de la RNA polimerasa.

NtcA también puede actuar como represor de determinados genes. En estos casos, la posición del sitio de unión solapa con la caja -10 o con el sitio de inicio de la transcripción, o se encuentra incluso después de éste, de forma que la unión de NtcA bloquea el acceso de la RNA polimerasa al promotor (Herrero *et al.*, 2001). Los casos mejor estudiados de represión por NtcA son los del gen *rbcl* (subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) en los heterocistos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Chastain *et al.*, 1990; Ramasubramanian *et al.*, 1994; Aldehni *et al.*, 2003) y los genes *gifA* y *gifB* (factores inactivantes de la GS) en ausencia de amonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (García-Domínguez *et al.*, 2000; Takatani y Omata, 2006; Galmozzi *et al.*, 2007).

También se han descrito algunos promotores dependientes de NtcA que no presentan la secuencia consenso de los sitios de unión de NtcA o la estructura del promotor canónico. En el primer caso, puede faltar uno de los dos tripletes del sitio de reconocimiento, lo que puede afectar negativamente a la afinidad de NtcA por estos sitios (Jiang *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 2001; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). De este tipo son los promotores de los genes *petH* y *nifHDK* de expresión en los heterocistos, que poseen una posible caja de unión de NtcA con cambios importantes respecto a la secuencia consenso de los sitios canónicos (Valladares *et al.*, 1999). Por otra parte, en el segundo caso se incluyen algunos promotores que se ajustan a los bacterianos regulados de clase I, en los que el sitio de unión del regulador se encuentra por delante de la posición -41,5 (Herrero *et al.*, 2004), como es el caso del promotor del operón *cox2*, de expresión en los heterocistos (Valladares, 2001).

En *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Synechococcus* sp. PCC 7942 se ha determinado que para que tenga lugar la activación de los promotores regulados por NtcA no es suficiente la presencia de una elevada concentración de esta proteína, puesto que la activación no se produce cuando se sobreexpresa el gen *ntcA* en condiciones represoras (Luque *et al.*, 2004; Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Esto sugiere que NtcA

puede existir en dos estados, uno inactivo en presencia de amonio y otro activo en su ausencia, de forma que la actividad de la proteína NtcA se modula en función de la disponibilidad de nitrógeno, respondiendo directa o indirectamente al balance C/N de las células. La acumulación de 2-OG en el citoplasma de las células como consecuencia de la deficiencia de nitrógeno combinado puede ser detectada por NtcA (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2003; Laurent *et al.*, 2005), habiéndose descrito que el 2-OG añadido al medio externo estimula la expresión de genes y actividades reguladas por NtcA en estirpes derivadas de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Anabaena* sp. PCC 7120 que expresan la permeasa KgtP de 2-OG de *E. coli* (Li *et al.*, 2003; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la afinidad de NtcA por muchos promotores regulados aumenta en presencia de 2-OG, como ocurre con el del gen *glnA* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Vázquez-Bermúdez, 2000; Tanigawa *et al.*, 2002; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b). Además, el 2-OG se requiere para que tenga lugar el inicio de la transcripción (Tanigawa *et al.*, 2002; Valladares *et al.*, 2008) y, de hecho, para la formación de los complejos abiertos en los promotores activados por NtcA (Valladares *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar una interacción directa del 2-OG con NtcA.

1.3.3. El heterocisto.

Los heterocistos (Figura 1.11 y Figura 1.13) son células diferenciadas a término con múltiples cambios, tanto estructurales como funcionales, con respecto a las células vegetativas del filamento. Están especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico en ambientes óxicos, y en ellos se localiza la nitrogenasa (Fay *et al.*, 1968; Murry *et al.*, 1984; Bergman *et al.*, 1986; Elhai y Wolk, 1990). Entre estas diferencias, encaminadas en su mayoría a crear un ambiente microóxico necesario para la protección y el funcionamiento óptimo del complejo de la nitrogenasa, destacan (1) la presencia de envueltas de polisacáridos y glucolípidos que dificultan la difusión de gases, entre ellos el oxígeno, (2) la carencia de actividad del fotosistema II, que es el responsable de la fotólisis del agua y la consiguiente emisión de oxígeno, (3) la expresión de la actividad hidrogenasa de consumo para recuperar energía y poder reductor a partir del hidrógeno producido de forma concomitante con amonio por el complejo de la nitrogenasa, (4) la existencia de actividades enzimáticas que protegen frente a especies reactivas de oxígeno, (5) una alta tasa respiratoria que ayuda a eliminar el oxígeno que aún pudiera entrar desde el exterior y (6) la propia expresión del complejo enzimático de la nitrogenasa y proteínas auxiliares del mismo (Stal y Krumbein, 1985, 1987; Wolk *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2004).

Los heterocistos se diferencian en respuesta a la deficiencia de nitrógeno combinado en el medio (Fogg, 1949), aunque existen indicaciones de que cambios en la luz o la temperatura también pueden estimular su formación (Wolk, 2000). En muchas de las cianobacterias formadoras de heterocistos se establece un patrón de desarrollo unidimensional en el que los heterocistos se disponen de forma semirregular, cada 10-15 células vegetativas, a lo largo del filamento, dando lugar a un organismo multicelular compuesto por dos tipos celulares interdependientes (Figura 1.11 y Figura 1.13). Durante el crecimiento diazotrófico este patrón se mantiene mediante la formación de nuevos heterocistos en puntos aproximadamente equidistantes entre dos heterocistos ya existentes.

La posición filogenética de las cianobacterias, la supuesta antigüedad del proceso de diferenciación de heterocistos y las interacciones célula-célula que se establecen durante el crecimiento diazotrófico hacen de este sistema un modelo de estudio muy interesante (Golden y Yoon, 1998). Parece ser que los heterocistos no fueron las primeras células diferenciadas que aparecieron en la Tierra. Se podría especular que *Clostridium* sp. ya presentaba la capacidad de esporular, y quizás las cianobacterias habían desarrollado con anterioridad la capacidad de formar aquinetos. Sin embargo, una diferencia importante es que mientras que el papel de las esporas, aquinetos y otras células latentes es el de

mantener la supervivencia de células individuales hasta que se den unas condiciones de temperatura y nutrición adecuadas para el crecimiento, el de los heterocistos consiste en proporcionar de forma inmediata un nutriente necesario para las células del filamento (Wolk *et al.*, 1994). La relación con las células vegetativas es mutualista, de forma que los heterocistos proporcionan a éstas nitrógeno fijado, mientras que las células vegetativas llevan a cabo la fijación fotosintética del CO₂ y proporcionan a los heterocistos compuestos reducidos de carbono.

1.3.3.1. Estructura de los heterocistos.

El proceso de diferenciación de los heterocistos implica profundos cambios estructurales de las células (Wolk *et al.*, 1994). Estos cambios incluyen la deposición de una envuelta multicapa por fuera de la membrana externa, la formación de una unión estrecha entre el heterocisto y las células adyacentes y la reordenación del sistema de membranas intracitoplasmático (Figura 1.16A) (Fay, 1992). La envuelta del heterocisto está constituida por dos capas (Figura 1.16B). La más interna es una capa laminada compuesta por glucolípidos específicos del heterocisto, que consisten en derivados de hexosas con largas cadenas de polihidroxialcoholes (Bryce *et al.*, 1972; Winkenbach *et al.*, 1972; Fay, 1992). Esta capa, que rodea al heterocisto excepto por las zonas de unión con las células vegetativas, representa una barrera frente a la difusión de gases. Por su parte, la capa más externa es homogénea y está formada por polisacáridos específicos, coincidiendo la composición de polisacáridos de esta capa con la de los aquinetos (Wolk, 1996). Esta capa constituye probablemente una barrera de protección frente a daños físicos de la capa de glucolípidos (Cardemil y Wolk, 1979; Murry y Wolk, 1989).

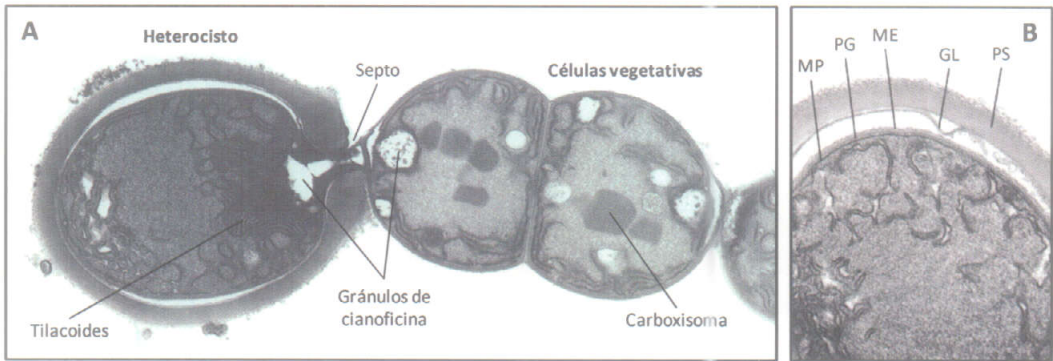


Figura 1.16. Estructura de los heterocistos de *Anabaena* sp. PCC 7120. A, fotografía al microscopio electrónico de un filamento de *Anabaena* sp. PCC 7120 en el que se observa un heterocisto terminal y la zona de unión entre el heterocisto y la célula vegetativa adyacente (septo), la zona del gránulo polar de cianoficina, perdido durante la preparación de la muestra, y las membranas intracitoplasmáticas (tilacoides) (imagen cortesía de I. Maldener). B, fotografía al microscopio electrónico que muestra un detalle de la envuelta del heterocisto donde se indica la localización de las membranas externa (ME) e interna (MP), la capa de peptidoglicano (PG), la capa laminada de glucolípidos (GL) y la capa homogénea de polisacáridos (PS). El amplio espacio entre la ME y la GL es un artefacto consecuencia del proceso de deshidratación durante la preparación de la muestra. Imagen tomada de Flores *et al.* (2006).

La envuelta del heterocisto, y especialmente la capa de glucolípidos, varía su grosor en respuesta a la concentración extracelular de oxígeno (Kangatharalingam *et al.*, 1992). Sin embargo, esta envuelta debe tener el grado de permeabilidad óptimo para permitir la entrada en la célula de una cantidad de N₂ suficientemente alta para que pueda ser reducido por la nitrogenasa y de O₂ suficientemente baja para que pueda ser consumido por la actividad respiratoria, de forma que éste se pueda mantener a niveles intracelulares mínimos (Walsby, 1985). También para minimizar la difusión de oxígeno al interior de los heterocistos, la zona de contacto entre éstos y las células vegetativas se reduce a un septo muy estrecho al lado del cual la deposición de la envuelta da lugar a la formación de una especie de «cuello» o canal (Lang y Fay, 1971; Giddings y Staehelin, 1978, 1981). Alternativamente, se ha propuesto que la pared del

heterocisto podría ser muy impermeable a los gases en general, y que el nitrógeno molecular entraría en los heterocistos desde las células vegetativas adyacentes, sólo a través de los septos, mediante un mecanismo regulado (Waisby, 2007).

Por último, durante el proceso de diferenciación tiene lugar un cambio en la distribución y naturaleza de las membranas intracitoplasmáticas, de forma que la distribución periférica característica de las membranas tilacoidales en las células vegetativas desaparece, formándose en el citoplasma del heterocisto un nuevo sistema de membranas más reticulado que se localiza próximo a los septos (Wildon y Mercer, 1963; Lang, 1965; Lang y Fay, 1971; Fay, 1992). Estas membranas presentan una alta concentración de enzimas respiratorias (Murry *et al.*, 1981; Wolk, 1996). Asimismo, los heterocistos presentan dos gránulos polares visibles al microscopio óptico, que corresponden a gránulos de cianoficina que se localizan próximos a los septos de unión con las células vegetativas (Sherman *et al.*, 2000), habiéndose sugerido que este polímero podría actuar como reservorio dinámico de nitrógeno (Allen, 1984; Carr, 1988; Mackerras *et al.*, 1990).

1.3.3.2. Adaptaciones metabólicas de los heterocistos.

Las condiciones microóxicas del heterocisto se deben en parte a una alta tasa respiratoria (Fay, 1992). Este intenso metabolismo respiratorio está determinado por una alta actividad de las enzimas de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato y de oxidasas respiratorias terminales y representa, además de un mecanismo muy importante de protección de la nitrogenasa, una fuente de ATP y poder reductor para la reducción de N_2 . En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han descrito dos agrupaciones de genes *cox* que determinan oxidasas respiratorias terminales de tipo hemo-cobre específicas de heterocistos (Jones y Haselkorn, 2002; Valladares *et al.*, 2003). Los heterocistos tienen una gran capacidad respiratoria de forma que, aunque representan una minoría respecto a las células vegetativas en el filamento, igualan o incluso superan la tasa respiratoria de éstas (Murry y Wolk, 1989). Por otro lado, para compensar la inactivación de la nitrogenasa por el oxígeno remanente en los heterocistos, también se produce una alta expresión de los genes *nif* que permite una elevada síntesis de los polipéptidos que forman el complejo de la nitrogenasa (Wolk *et al.*, 1994).

Durante el desarrollo de los heterocistos, el aparato fotosintético se reorganiza de manera que no existe actividad del fotosistema II ni la consecuente producción de oxígeno por fotólisis del agua en los mismos (Bradley y Carr, 1971; Donze *et al.*, 1972). Esto también representa una adaptación celular orientada a mantener bajos los niveles de oxígeno en los heterocistos (Fay, 1992; Wolk *et al.*, 1994). Los heterocistos maduros poseen una cantidad reducida de pigmentos fotosintéticos respecto a las células vegetativas, dado que en ellos no hay síntesis *de novo* de ficobiliproteínas y los pigmentos fotosintéticos son parte de los que se encontraban en las células vegetativas a partir de las cuales se han desarrollado (Yamanaka y Glazer, 1983). Estas ficobiliproteínas permanecen activas, constituyendo el complejo antena que transfiere energía al fotosistema I (Peterson *et al.*, 1981), y permiten que en los heterocistos maduros se mantenga la fotofosforilación cíclica asociada al fotosistema I generándose ATP. A través del fotosistema I también puede darse un flujo no cíclico de electrones transferidos desde H_2 (generado por la nitrogenasa), NADH o NADPH por medio de hidrogenasas y deshidrogenasas. El ATP y poder reductor así generados pueden ser utilizados en la fijación de nitrógeno. Como consecuencia de la reducción del oxígeno por el fotosistema I también se generan radicales superóxido, que se eliminan por acción de la enzima superóxido dismutasa presente en los heterocistos (Wolk *et al.*, 1994).

Los heterocistos carecen de la capacidad de fijar CO_2 fotosintéticamente mediante el ciclo de Calvin, de forma que el poder reductor y la energía que se generan en ellos se dirige principalmente a la fijación de N_2 . Esto se debe a que carecen de las actividades ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

(RuBisCO) (Winkenbach y Wolk, 1973; Stewart y Codd, 1975; Elhai y Wolk, 1990) y fosforribuloquinasa, enzimas clave en el ciclo de Calvin (Wolk, 1982). Estos cambios en el metabolismo de la célula limitan a los heterocistos a un metabolismo fotoheterotrófico dependiente de las células vegetativas, las cuales les suministran los compuestos orgánicos que proporcionan ATP y poder reductor para la fijación de nitrógeno y los esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno fijado (Wolk, 1968). Se desconoce qué compuestos carbonados son importados desde las células vegetativas, aunque podría tratarse de carbohidratos, como glucosa-6-fosfato, 6-fosfogluconato y en particular sacarosa (Wolk, 1982; Wolk *et al.*, 1994; Wolk, 2000; Curatti *et al.*, 2002). En los heterocistos, los disacáridos pueden ser hidrolizados en sus componentes, y éstos degradados por la vía glucolítica y oxidados a través del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato.

1.3.3.3. Diferenciación de los heterocistos.

Las características morfológicas y fisiológicas del heterocisto son la consecuencia de un programa de expresión génica diferencial con respecto al que tiene lugar en las células vegetativas. Durante el proceso de desarrollo de los heterocistos se produce la activación secuencial de numerosos genes, algunos de los cuales determinan proteínas reguladoras del proceso (Wolk *et al.*, 1994; Golden y Yoon, 1998; Wolk, 2000; Golden y Yoon, 2003; Herrero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Entre los genes que se expresan durante este proceso se podría distinguir entre los que se inducen en los estadios iniciales, durante el proceso de maduración y en el heterocisto maduro. La regulación del proceso de diferenciación tiene lugar principalmente a nivel transcripcional (Wolk *et al.*, 1994). Por ello, han de existir distintos tipos de promotores que dirijan la expresión génica en los diferentes tipos celulares, ya que algunos genes se expresan únicamente en los heterocistos maduros, como el operón *nifHDK*, que comprende los genes estructurales de la nitrogenasa (Elhai y Wolk, 1990), otros se expresan activamente en las células vegetativas pero no en los heterocistos, como el operón *rbcLXS*, que determina la RuBisCO (Elhai y Wolk, 1990) y, por último, hay genes activos en ambos tipos celulares, como *glnA*, que determina la glutamina sintetasa (Turner *et al.*, 1983; Frías *et al.*, 1994; Valladares *et al.*, 2004).

Cuando las células detectan la deficiencia de nitrógeno como consecuencia de la ausencia de nitrógeno combinado en el medio se inicia el proceso de diferenciación mediante la degradación de proteínas por acción de enzimas proteolíticas (Fleming y Haselkorn, 1974; Wood y Haselkorn, 1976). Esta respuesta supone la movilización en todas las células vegetativas de productos nitrogenados de almacenamiento, como los gránulos de cianoficina (Simon, 1987) y las ficobiliproteínas (Glazer, 1987). El proceso de degradación de proteínas y cianoficina va asociado a la síntesis de nuevas proteínas, lo que resulta en la reorganización de la maquinaria bioquímica de la célula en desarrollo.

Como se ha mencionado anteriormente, la distribución de los heterocistos no es aleatoria, sino que obedece a un patrón que varía de unas estirpes a otras y que se mantiene durante el crecimiento diazotrófico. En algunos géneros, como *Anabaena* y *Nostoc*, los heterocistos se encuentran localizados a intervalos semirregulares a lo largo del filamento. Probablemente, el mecanismo que controla el patrón de diferenciación de los heterocistos dependa de las diferencias en el estado nutricional de las distintas células, de la posición de las mismas en el ciclo celular y de interacciones célula-célula (Wolk, 2000). Se ha propuesto que el patrón de distribución de los heterocistos a lo largo del filamento dependería de la difusión intercelular de sustancias. Existen dos modelos, denominados modelo altruista y modelo egoísta, para explicar el establecimiento de dicho patrón. Según el modelo altruista, la célula que alcanza el mayor grado de deficiencia nutricional inicia el proceso de desarrollo, liberando simultáneamente una sustancia inhibidora del mismo (Wolk, 1989). Inicialmente se propusieron como sustancias inhibidoras que pasasen de célula a célula la Arg y el Asp, ambas constituyentes de los gránulos de cianoficina, y la

Gln (Wolk *et al.*, 1994), pero ninguna de éstas parece tener un efecto inhibitorio sobre el proceso de diferenciación (Thomas *et al.*, 1977; Thiel y Leone, 1986). Sin embargo, recientemente se ha descrito el gen *patS*, que se caracteriza por expresarse a alto nivel en los proheterocistos (Yoon y Golden, 1998) y cuyo producto es un polipéptido de 17 aminoácidos que parece tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo, puesto que su ausencia produce la formación de heterocistos en cadena y la adición al medio de un subproducto del mismo (PatS5, RGSGR) inhibe la diferenciación. Por su parte, el modelo egoísta propone que las células del filamento deficientes en nitrógeno pondrían en funcionamiento sistemas de transporte de alta afinidad para adquirir nutrientes de las células vecinas, lo que retrasaría la diferenciación de las primeras (Wolk, 1989, 2000).

Para que puedan producirse los primeros estadios de la diferenciación se requiere la participación del regulador transcripcional NtcA, descrito anteriormente, y de HetR, que es el primer factor de regulación positiva específico del desarrollo de los heterocistos (Buikema y Haselkorn, 1991a, b; Black *et al.*, 1993; Khudiyakov y Golden, 2004). Ambos reguladores presentan una dependencia mutua en su expresión (Muro-Pastor *et al.*, 2002). La acción de NtcA no sólo se requiere al inicio del proceso de diferenciación, sino también durante el resto de los estadios del desarrollo y para el funcionamiento del heterocisto maduro. Este requerimiento se debe al papel de NtcA como activador transcripcional de genes tanto estructurales como reguladores cuyos productos participan en el proceso de diferenciación o en el metabolismo del heterocisto (Herrero *et al.*, 2004). Los genes activados por NtcA no tienen por qué ser específicos de los heterocistos, ya que algunos se activan también en las células vegetativas en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, como ocurre con el gen *glnA*. Por su parte, el gen *hetR* se autorregula positivamente, expresándose a un nivel basal en presencia de amonio o nitrato e induciéndose rápidamente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Buikema y Haselkorn, 1991b; Black *et al.*, 1993). Se desconoce el mecanismo de acción de HetR, pero *in vitro* presenta actividad de unión al DNA, uniéndose a su propio promotor y a las regiones promotoras de *patS* (Huang *et al.*, 2004). Otro gen de respuesta temprana dependiente de NtcA es *hetC*, cuyo producto presenta homología con exportadores de tipo ABC (Khudiyakov y Wolk, 1997; Muro-Pastor *et al.*, 1999).

Durante el proceso de maduración tiene lugar la síntesis de la envuelta del heterocisto. En este estadio se expresan los genes *hetIN*, *hglB* (*hetM*), *hglCD* y *hglE*, que podrían estar implicados en la biosíntesis de los glucolípidos de la envuelta (Black y Wolk, 1994; Lambalot *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997; revisado en Wolk, 2000; Callahan y Buikema, 2001), así como el operón *devBCA* y los genes *hglK* y *hgdD*, que podrían mediar la exportación de dichos glucolípidos o de proteínas necesarias para su deposición (Black *et al.*, 1995; Fiedler *et al.*, 1998; Fiedler *et al.*, 2001; Moslavac *et al.*, 2007). Los genes *hepA*, *hepB*, *hepC* o *hepK* se expresan también en un estadio intermedio del proceso y están implicados en la biosíntesis y deposición de los polisacáridos de la envuelta (Wolk *et al.*, 1988; Holland y Wolk, 1990; Wolk *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1998; Wolk *et al.*, 1999; revisado en Wolk, 2000), así como los de los agrupamientos *cox2* y *cox3*, que determinan las oxidasas terminales específicas de los heterocistos (Valladares *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2007).

En el estadio final del desarrollo de los heterocistos, una vez que la envuelta está completamente constituida, se produce la síntesis de las proteínas necesarias para el funcionamiento del heterocisto maduro. En esta etapa se produce la expresión de los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifHDK*) y de la ferredoxina específica de los heterocistos (*fdxH*) (Böhme y Haselkorn, 1988), así como de genes como *zwf*, que determina la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima clave de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Summers *et al.*, 1995; Wolk, 1996), o *hupLS*, que determinan la hidrogenasa específica de los heterocistos (Carrasco *et al.*, 1995).

1.3.3.4. Relaciones intercelulares.

El hecho de que la fijación fotosintética de CO_2 y la fijación de N_2 tengan lugar en células diferentes exige que haya un intercambio de metabolitos entre las células vegetativas y los heterocistos, dado que las células vegetativas deben proporcionar compuestos reducidos de carbono a los heterocistos (Wolk, 1968; Jüttner, 1983) y éstos, a su vez, deben suministrar a las células vegetativas el nitrógeno fijado (Wolk *et al.*, 1974; Wolk *et al.*, 1976). La identidad de los compuestos transferidos, así como el mecanismo mediante el que se produce la transferencia, son aspectos desconocidos, aunque se han hecho algunas propuestas. A partir de experimentos de marcaje con $^{14}\text{CO}_2$ (Jüttner, 1983), se ha sugerido que la alanina, el glutamato y algunos azúcares, como la glucosa-6-fosfato, podrían transferirse desde las células vegetativas hasta los heterocistos. En este contexto, se ha descrito que *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta un metabolismo de la sacarosa muy activo en condiciones de cultivo diazotróficas, y que la actividad de la enzima invertasa se incrementa en estas condiciones, lo que también apoya un papel de la sacarosa como vehículo de transferencia de carbono reducido (Wolk *et al.*, 1994; Curatti *et al.*, 2002). Por otra parte, experimentos de marcaje con $^{15}\text{N}_2$ han permitido sugerir que el nitrógeno fijado en los heterocistos se transfiera a las células vegetativas en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1974), siendo la Gln el candidato principal (Wolk *et al.*, 1976), aunque también podrían transferirse otros como la Ala, la Arg o el Asp, dado que los heterocistos poseen la maquinaria enzimática necesaria para la biosíntesis de estos compuestos (Wolk *et al.*, 1994). Dado que los heterocistos presentan actividad GS pero carecen de actividad GOGAT (Thomas *et al.*, 1977; Martín-Figueroa *et al.*, 2000), se ha propuesto que sería necesaria la transferencia de Glu de las células vegetativas a los heterocistos como sustrato de la GS para la asimilación de amonio, generándose así la Gln que sería transferida de los heterocistos a las células vegetativas.

La vía de intercambio de moléculas entre las células vegetativas y los heterocistos se desconoce. Se ha sugerido, por una parte, la existencia de un citoplasma continuo entre las células, por medio de conexiones citoplasmáticas denominadas *microplasmodesmata*, que posibilitaría el intercambio por difusión (Lang y Fay, 1971; Giddings y Staehelin, 1978, 1981), pero realmente no hay pruebas de la existencia de tal continuidad citoplasmática (Flores *et al.*, 2006). Aunque estas uniones intercelulares podrían permitir el intercambio de metabolitos, también se ha sugerido que podría tratarse de complejos proteicos integrales de membrana implicados en el anclaje de las células en el filamento (Flores *et al.*, 2006). Sin embargo, estas dos funciones podrían estar relacionadas. Así, recientemente se ha descrito lo que parece ser una transferencia intercelular directa de un sustrato artificial, la calceína, que requiere el concurso de la proteína de membrana SepJ (Mullineaux *et al.*, 2008), que se localiza en los septos entre las células del filamento manteniendo la cohesión del mismo (Flores *et al.*, 2007). Por otra parte, dado que la membrana externa es continua a lo largo del filamento, se ha propuesto la existencia de un espacio periplásmico continuo que permitiría el intercambio de metabolitos por esta vía, estando implicadas en este proceso permeasas de la membrana plasmática que mediarían el transporte de sustancias entre el periplasma y el citoplasma (Flores *et al.*, 2006). Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que algunos mutantes de sistemas de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120 están afectados específicamente en la capacidad de crecimiento diazotrófico (Montesinos *et al.*, 1995). De hecho, se ha demostrado que el periplasma del filamento es funcionalmente continuo en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Mariscal *et al.*, 2007). En resumen, el filamento cianobacteriano está constituido por células individuales confinadas por una membrana externa común y continua a lo largo del mismo, ya que ésta no entra en los *septa* intercelulares (Flores *et al.*, 2006), y las relaciones intercelulares parecen exigir la participación de proteínas de membrana.

1.4. Transporte de aminoácidos en las cianobacterias.

Algunos aminoácidos como la arginina, la glutamina y la asparagina pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por algunas estirpes de cianobacterias (Neilson y Larsson, 1980; Flores y Herrero, 1994). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en enterobacterias y otros grupos de bacterias cuyos hábitats suelen ser ricos en aminoácidos, esta función no es general en cianobacterias. Para la utilización del aminoácido como fuente de nitrógeno, la estirpe en cuestión debe poseer no sólo las enzimas necesarias para su metabolización, sino también un sistema de transporte que garantice la adecuada acumulación intracelular del aminoácido.

1.4.1. Transporte de aminoácidos neutros.

Mediante la utilización de aminoácidos marcados radiactivamente se ha demostrado la capacidad de transporte de aminoácidos neutros de distintas cianobacterias, incluyendo estirpes unicelulares como *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Synechococcus* sp. PCC 7942, filamentosas no formadoras de heterocistos como *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 y filamentosas formadoras de heterocistos como *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* (ATCC 29413 o PCC 7937), *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Fischerella muscicola* UTEX 1829 (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997). La obtención de mutantes resistentes a diversos análogos tóxicos de aminoácidos ha permitido adscribir dicha capacidad de transporte a una o más permeasas, según el caso. Mientras que en la mayoría de las estirpes estudiadas se ha encontrado un único sistema de transporte para aminoácidos neutros (Montesinos *et al.*, 1997), en *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito la existencia de dos sistemas, denominados N-I y N-II. Los dos sistemas son permeasas de alta afinidad y tienen especificidades solapantes, pero no idénticas. El sistema N-I es el responsable del transporte de Gly, Leu, Phe y Pro, mientras que los aminoácidos Ala, Asn, Gln, Met, Ser y Thr se transportan por ambos sistemas (Montesinos *et al.*, 1995). Los mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 que carecen de los sistemas de transporte N-I y/o N-II están afectados en el crecimiento diazotrófico (Montesinos *et al.*, 1995). También se ha demostrado que esta estirpe es capaz de transportar Gln, Glu (Flores y Muro-Pastor, 1988) y Phe (Xu y McAuley, 1990), y se han determinado los parámetros cinéticos correspondientes, obteniéndose unos valores de K_s de 33 μM , 0,5 mM y 6,7 μM , respectivamente.

En el caso de *Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp. PCC 7413 y *Calothrix* sp. PCC 7601, los mutantes de transporte de aminoácidos neutros están ligeramente afectados también en el transporte de aminoácidos ácidos y básicos. De hecho, como ya se ha mencionado, en general los sistemas de transporte de aminoácidos de cianobacterias no presentan un alto grado de especificidad, resultando este punto extremo en el caso de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, que presenta un sistema de transporte de aminoácidos que ha de considerarse como una permeasa general de aminoácidos capaz de transportar aminoácidos básicos, ácidos y neutros. En el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942, el sistema de transporte de aminoácidos neutros sí muestra una cierta especificidad para aminoácidos no polares, como la Ala, la Leu y la Phe (Montesinos *et al.*, 1997). En *Anabaena variabilis*, además, se ha demostrado la capacidad de transportar Leu, en un proceso dependiente de energía, con una K_s de 10,8 μM (Thiel, 1988).

Más recientemente se ha caracterizado el sistema Nat (del inglés *Neutral Amino acid Transport*) de *Synechocystis* sp. PCC 6803, perteneciente a la familia HAAT de los transportadores de tipo ABC (véase el apartado 1.2.3.2), que es capaz de transportar aminoácidos con diferentes propiedades químicas. Esta permeasa transporta aminoácidos neutros, His y Gln con alta afinidad (Quintero *et al.*, 2001), pero no aminoácidos básicos y Glu (Labarre *et al.*, 1987), y está constituido por al menos 5 genes distribuidos separadamente en el genoma, los cuales determinan dos proteínas de unión de ATP (NatA [Slr0467] y

NatE [Slr1881]), dos proteínas Integrales de membrana (NatC [Slr0146] y NatD [Slr0949]) y una proteína periplásmica de unión de sustrato (NatB [Slr0559]) (Montesinos *et al.*, 1997; Quintero *et al.*, 2001). Este sistema es homólogo al sistema Bra de *P. aeruginosa*, y la mutación de sus genes da lugar a una deficiencia en el transporte de aminoácidos neutros (Ala, Gly, Leu, Phe, Pro y Ser), además de una disminución en el transporte de His, Glu y Asp (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1997; Quintero *et al.*, 2001). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han identificado los genes correspondientes a las proteínas NatC (Alr1047), NatA (Alr1046) y NatB (Alr1834), homólogas a las de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que pertenecen al sistema N-I (Montesinos, 1997; Picossi, 2003).

1.4.2. Transporte de aminoácidos básicos.

La capacidad de transportar aminoácidos básicos no parece ser tan general en las cianobacterias como la de transportar aminoácidos neutros, pero en el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito un sistema de alta afinidad para el transporte de aminoácidos básicos, denominado Bgt (del Inglés *Basic Amino Acid and Glutamine Transporter*), que puede transportar también, aunque con baja afinidad, Gln (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Este sistema de transporte se ha identificado mediante el aislamiento de mutantes resistentes a la canavanina y la hidroxilisina (análogos tóxicos de la Arg y la Lys, respectivamente). Para el transporte de Gln se han encontrado dos componentes cinéticos en esta cianobacteria, habiéndose atribuido el de baja afinidad al sistema de transporte Bgt de aminoácidos básicos (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Es de destacar el hecho de que la actividad de transporte de aminoácidos básicos encontrada en *Synechocystis* sp. PCC 6803 sea más alta que cualquiera de las otras actividades de transporte de aminoácidos conocidas en cianobacterias.

Con respecto a *Anabaena* sp. PCC 7120 se han descrito dos sistemas, uno activo de alta afinidad y otro pasivo de baja afinidad, para el transporte de Arg, Lys, His y Orn (Herrero y Flores, 1990). El sistema de alta afinidad presenta una K_s de 1,7 μM para la Arg y de 1,9 μM para la Lys, mientras que el sistema de baja afinidad muestra unos valores de K_s de 0,75 mM para la Arg y de 0,11 mM para la Lys. Tanto el sistema de alta como el de baja afinidad contribuyen al crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizando la arginina como fuente de nitrógeno, aunque este aminoácido no reprime las actividades nitrogenasa y nitrato reductasa de las células (Herrero y Flores, 1990). Por otra parte, en *Anabaena variabilis* (ATCC 29413 ó PCC 7937) se han identificado dos sistemas de transporte de glutamina, uno de alta afinidad con una K_s de 13,8 μM , y otro de baja afinidad con una K_s de 1,1 mM. El de alta afinidad no parece ser un transportador específico de Gln, sino que también puede transportar aminoácidos neutros y Glu (Chapman y Meeks, 1983). Se ha identificado un mutante resistente a L-metionina-DL-sulfoximina (MSX, análogo tóxico de la metionina y el glutamato) afectado al mismo tiempo en el transporte de alta afinidad de Gln y de Glu, lo que sugiere la existencia de algún componente común para el transporte de ambos aminoácidos. Igualmente, se ha encontrado una notable capacidad de transporte de arginina en *Nostoc* sp. PCC 7413 (Montesinos *et al.*, 1997).

En cuanto a la caracterización molecular de los transportadores de aminoácidos básicos se conocen los genes implicados en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y, parcialmente, en *Anabaena* sp. PCC 7120. En la primera se ha caracterizado una permeasa de tipo ABC que está formada por una ATPasa, BgtA (Slr1735), y una proteína de fusión entre el componente de membrana y la proteína periplásmica de unión de sustrato, BgtB (Slr1270) (Quintero *et al.*, 2001), mientras que de la segunda sólo se conoce, por homología con la misma proteína de *Synechocystis* sp. PCC 6803, BgtB (Alr3187) (Picossi, 2003). Sin embargo, se desconoce si estas dos proteínas actúan como homodímeros o si hay más elementos del transportador.

1.4.3. Transporte de aminoácidos ácidos.

Las actividades de transporte de Glu y Asp encontradas en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos son, cuando se ensayan a baja concentración de sustrato, menores que las actividades de transporte de aminoácidos neutros o básicos (Montesinos *et al.*, 1997). *Anabaena* sp. PCC 7120 muestra una K_s elevada para el transporte de aminoácidos ácidos (Flores y Muro-Pastor, 1988), a pesar de que los valores de V_{max} son similares a los exhibidos para el transporte de aminoácidos neutros o básicos (Montesinos *et al.*, 1995). El efecto limitado que produce la inhibición del metabolismo energético de la célula sobre el transporte de Asp y Glu y los datos cinéticos (K_s alta) sugieren que esta permeasa pudiera ser de tipo pasivo. *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 presenta, sin embargo, un sistema de alta afinidad para el transporte de Asp y Glu, además del sistema general de aminoácidos comentado anteriormente (Montesinos *et al.*, 1997). Por último, en *Anabaena variabilis* se ha descrito la existencia de dos sistemas de transporte para el Glu, uno de mayor afinidad que muestra una K_s de 100 μ M y otro de menor afinidad con una K_s de 1,4 mM (Chapman y Meeks, 1983). *Synechocystis* sp. PCC 6803 muestra una elevada capacidad para transportar Glu, pero no Asp. La actividad de transporte de Glu de esta cianobacteria es dependiente de Na^+ , habiéndose identificado dos permeasas responsables de la misma: GltS (Slr1145), un transportador secundario de tipo monocomponente, y GtrABC (Sll1102, Sll1103 y Sll1104, respectivamente), una permeasa de tipo TRAP-T en la que GtrA y GtrB corresponden a las proteínas integrales de membrana y GtrC a la proteína periplásmica de unión de sustrato (Quintero *et al.*, 2001). Sin embargo, la actividad conjunta de las dos permeasas representa sólo un 60% de la actividad de transporte de Glu de *Synechocystis* sp. PCC 6803, de modo que en esta cianobacteria debe existir al menos otro sistema dependiente de Na^+ para el transporte de este aminoácido (Quintero *et al.*, 2001).

1.4.4. Papel fisiológico de los sistemas de transporte de aminoácidos.

Se ha establecido un papel fisiológico de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros, que como se ha visto están ampliamente distribuidos en las cianobacterias, en la recuperación de aminoácidos hidrofóbicos que se pierden de las células, probablemente por difusión, aunque no se puede descartar la exportación activa. Así, los mutantes de transporte de aminoácidos neutros de distintas estirpes de cianobacterias acumulan ciertos aminoácidos en el medio de cultivo, aparentemente debido a su incapacidad para recuperarlos una vez que éstos han salido de las células. Entre estos aminoácidos se encuentran siempre la Ala, la Val, la Phe, la Ile y la Leu (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997). En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha sugerido un posible papel nutricional del sistema Nat, puesto que, aunque pobre, la Pro puede servir como fuente de nitrógeno para esta cianobacteria (Quintero *et al.*, 2001). En el caso de los sistemas de transporte de aminoácidos básicos, parece que el papel fisiológico es el de transportar aminoácidos que puedan servir como fuente de nitrógeno, puesto que, como ya se ha descrito en el apartado 1.3.2.3.2, tanto *Anabaena* sp. PCC 7120 como *Synechocystis* sp. PCC 6803 pueden crecer utilizando Arg como única fuente de nitrógeno (Flores y Muro-Pastor, 1990; Herrero y Flores, 1990). Por otra parte, se desconoce el papel que puedan desempeñar los sistemas de transporte de aminoácidos ácidos en la fisiología de las estirpes que los poseen.

Por último, en *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha propuesto que los sistemas de transporte de aminoácidos puedan tener algún papel en la nutrición nitrogenada del filamento en condiciones de cultivo diazotróficas, puesto que algunos mutantes espontáneos de estos sistemas de transporte están también afectados específicamente en la capacidad de crecimiento a expensas del nitrógeno atmosférico (Montesinos *et al.*, 1995).

Es importante destacar que la homología entre una proteína de transporte y otras proteínas de las bases de datos no identifica con seguridad la naturaleza del sustrato de las últimas (Quintero *et al.*, 2001), probablemente debido a la evolución independiente de los transportadores en los distintos organismos. No obstante, existe gran similitud entre los sistemas de transporte de unas cianobacterias y otras, y en este caso sí parece posible hacer una predicción ensayable del aminoácido sustrato en cuestión. Los estudios llevados a cabo hasta ahora han permitido determinar 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.

1.5. Catabolismo de la alanina.

La alanina deshidrogenasa (AlaDH; EC 1.4.1.1) cataliza la desaminación oxidativa reversible de L-alanina a piruvato, con la reducción concomitante de NAD^+ , según la siguiente reacción:



La mayoría de las enzimas AlaDH purificadas hasta la fecha constituyen homohexámeros en las que cada subunidad presenta un tamaño de aproximadamente 40 kDa, como en muchas bacterias del género *Bacillus* (Ohshima y Soda, 1990), *Mycobacterium tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1992), *Streptomyces phaeochromogenes* (Itoh y Morikawa, 1983) y en las cianobacterias *Phormidium lapideum* (Sawa *et al.*, 1994) y *A. cylindrica* (Rowell y Stewart, 1975). En otros casos, se encuentra en forma de octámeros, con subunidades de 48 kDa aproximadamente, como en *Streptomyces aureofaciens* (Vancurova *et al.*, 1988), o en forma de tetrámeros en los que cada subunidad presenta un tamaño de 43 ó 51 kDa, como en los bacteroides de los nódulos de la soja (Smith y Emerich, 1993) y en *Streptomyces fradiae* (Vancura *et al.*, 1989), respectivamente.

Como se ha descrito en el apartado 1.3.2.5, en las cianobacterias la enzima AlaDH permite la incorporación de amonio a esqueletos carbonados, aunque generalmente tiene un papel secundario (Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). Sin embargo, en ciertas condiciones, o en determinadas estirpes, esta enzima puede tener una relevancia mayor (Rowell y Stewart, 1975; Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978; Lahmi *et al.*, 2006). Se ha descrito actividad AlaDH en *Anabaena cylindrica* (Haystead *et al.*, 1973; Batt y Brown, 1974), *Anabaena variabilis* (Scott y Fay, 1972), *Anacystis nidulans* (Batt y Brown, 1974) y algunas otras estirpes (Neilson y Doudoroff, 1973), habiéndose purificado y caracterizado la enzima a partir de la cianobacteria fijadora de N_2 *A. cylindrica* (Rowell y Stewart, 1975) y de la no fijadora de N_2 *P. lapideum* (Sawa *et al.*, 1994). Asimismo, esta última se ha cristalizado, habiéndose analizado su estructura tridimensional (Figura 1.17) (Baker *et al.*, 1998; Sedelnikova *et al.*, 1998). En algunas cianobacterias, como *A. cylindrica* (Meeks *et al.*, 1977) y *Cylindrospermum licheniforme* (Meeks *et al.*, 1978), la Ala se forma principalmente mediante la AlaDH, aunque en otras, como *A. variabilis*, se forma principalmente mediante aminotransferasas de Glu (Meeks *et al.*, 1978).

En *A. cylindrica*, la enzima AlaDH se expresa tanto en los heterocistos como en las células vegetativas, siendo la actividad de la misma más elevada en cultivos diazotróficos que en aquellos que utilizan nitrógeno combinado (Rowell y Stewart, 1975). Asimismo, la deficiencia extrema de nitrógeno (incubación con argón:CO₂) produce un aumento en la actividad específica de la AlaDH de hasta 8 veces con respecto a cultivos en condiciones diazotróficas. Este aumento se debe principalmente a un incremento de la síntesis de la proteína (Rowell y Stewart, 1975). Aunque la Ala puede formarse mediante la actividad aminante de esta enzima, en cultivos diazotróficos de esta cianobacteria la

asimilación primaria de NH_4^+ ocurre principalmente a través de la GS, pero la relevancia de la AlaDH puede aumentar con la disponibilidad de nitrógeno (Rowell y Stewart, 1975). La K_m para NH_4^+ de la AlaDH, aunque es variable dependiendo del pH al que tiene lugar la reacción, siempre es superior ($> 8 \text{ mM}$) a la que presenta la GS (1 mM en *A. cylindrica* y $20 \text{ }\mu\text{M}$ en *Anabaena* sp. PCC 7120) (Dharmawardene *et al.*, 1973; Orr y Haselkorn, 1981). Dado que la AlaDH también funciona en el sentido desaminante de la reacción, es posible que pueda desempeñar un papel significativo en el catabolismo de Ala en condiciones de deficiencia de nitrógeno y, posiblemente también de carbono, al permitir una ruta para la síntesis de dos compuestos metabólicos clave, NH_4^+ y piruvato (Rowell y Stewart, 1975). En resumen, la asimilación de amonio a través de esta enzima puede ser importante en cultivos con un exceso de nitrógeno disponible, mientras que la actividad desaminante de la enzima puede ser importante en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Rowell y Stewart, 1975).

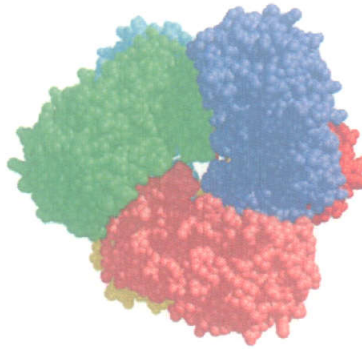


Figura 1.17. Ensamblaje de un hexámero de la alanina deshidrogenasa de *Phormidium lapideum*. La representación del hexámero se muestra desde una vista inferior, con tres subunidades a cada uno de los dos lados. Figura tomada de Baker *et al.* (1998).

En *Synechococcus* sp. PCC 7942, la AlaDH tiene un importante papel en la degradación de Ala en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, siendo importante también en la adaptación de las células a estas condiciones (Lahmi *et al.*, 2006). Generalmente, la degradación de proteínas es un aspecto importante de la adaptación a la limitación de nutrientes, dado que permite el reciclaje de aminoácidos para la síntesis *de novo* de proteínas durante la deficiencia. La composición de aminoácidos de las proteínas degradadas no coincide necesariamente con los aminoácidos que se necesitan para la producción de nuevas proteínas, por lo que se hace esencial el catabolismo de los aminoácidos para una adaptación adecuada al estrés nutricional (Lahmi *et al.*, 2006). Así, la desaminación de la Ala por acción de la AlaDH, produciendo NH_4^+ y piruvato, puede proporcionar a las células una fuente de nitrógeno en condiciones de deficiencia. Aunque varias transaminasas podrían ayudar a las células a metabolizar la Ala, la acumulación de este aminoácido cuando se inactiva el gen *ald* (AlaDH) indica que esta enzima tiene un papel central en su degradación. Una degradación alterada de este aminoácido puede impedir la formación en el momento adecuado de proteínas específicas y, por lo tanto, afectar a algunas de las respuestas a la adaptación de nitrógeno (Lahmi *et al.*, 2006). Así pues, en *Synechococcus* sp. PCC 7942 esta enzima desempeña un importante papel en la movilización de fuentes de nitrógeno en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, siendo clave también en la modulación de la degradación de los ficobilisomas específicamente en estas condiciones (Lahmi *et al.*, 2006). Se ha sugerido asimismo que una concentración elevada de Ala interfiere en las funciones celulares que modulan las respuestas a la adaptación de nitrógeno (Lahmi *et al.*, 2006).

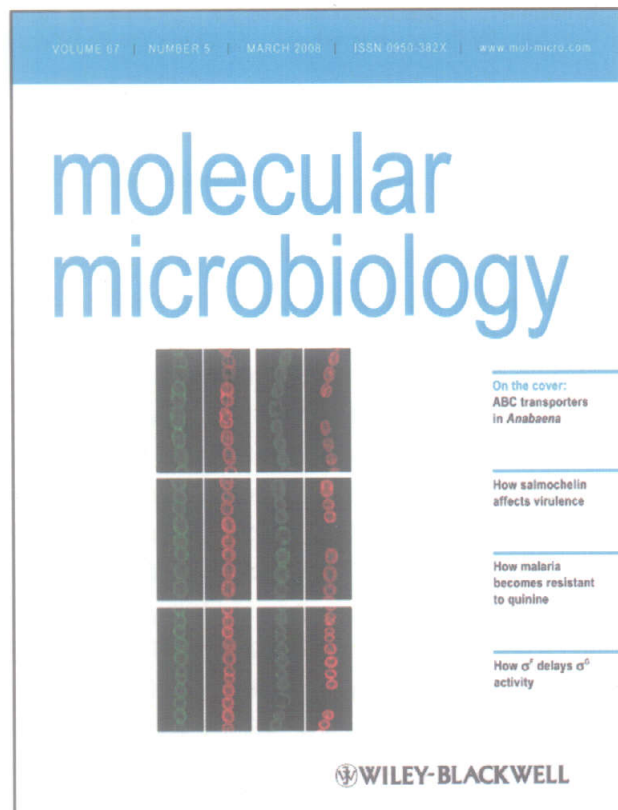
1.6. Objetivos de este trabajo.

El objetivo que nos planteamos al comienzo de este trabajo fue la caracterización de los sistemas de transporte de aminoácidos en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, así como el estudio de la implicación de los mismos en la transferencia de nitrógeno entre las células vegetativas y los heterocistos y la identificación de metabolitos utilizados como portadores de nitrógeno en dicha transferencia.

Parte de los resultados de este trabajo ya han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

Picossi, S., Montesinos, M. L., Pernil, R., Lichtlé, C., Herrero, A. y Flores, E. (2005) ABC-type neutral amino acid permease N-I is required for optimal diazotrophic growth and is repressed in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 57: 1582-1592

Pernil, R., Picossi, S., Mariscal, V., Herrero, A. y Flores, E. (2008) ABC-type amino acid uptake transporters Bgt and N-II of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 share an ATPase subunit and are expressed in vegetative cells and heterocysts. *Mol. Microbiol.* 67: 1067-1080



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Organismos y condiciones de cultivo.

2.1.1. Cianobacterias.

2.1.1.1. Estirpes empleadas.

En este trabajo se ha utilizado como material biológico de estudio la cianobacteria *Anabaena* sp. (también conocida como *Nostoc* sp.) PCC 7120 (ATCC 27893), perteneciente a la sección IV de la clasificación taxonómica propuesta por Rosmarie Rippka (Rippka *et al.*, 1979). Ésta es una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos, autótrofa obligada, cuyo genoma tiene un tamaño de 7,2 Mb. Adicionalmente, se han utilizado estirpes mutantes derivadas de esta cianobacteria, generadas o no en este trabajo, cuyo genotipo se describe en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Resistencia a antibióticos	Referencia
<i>Estirpes no generadas en este trabajo</i>			
216	<i>hetR</i> S179N	Sin resistencia	Bulkema y Haselkorn, 1991a
CSX60	<i>natA::C.S3</i>	Sm Sp	Montesinos, 1997
CSX62	<i>natC::C.S3</i>	Sm Sp	Montesinos, 1997
CSS6	<i>natB::C.S3</i>	Sm Sp	Picossi, 2003
CSS8	<i>bgtB::C.K3</i>	Nm	Picossi, 2003
CSS18	<i>hetR</i> S179N <i>natA::C.S3</i>	Sm Sp	Picossi <i>et al.</i> , 2005
<i>Estirpes generadas en este trabajo</i>			
CSR1	<i>all0342::pRL424</i>	Nm	
CSR4	<i>all2911::pRL424</i>	Nm	
CSR5	<i>all2912::pRL424</i>	Nm	
CSR6	<i>alr2536::pRL424</i>	Nm	
CSR7a	<i>alr3027::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR7b	<i>alr3027::pRL424</i>	Nm	
CSR8a	<i>alr4166::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR8b	<i>alr4166::pRL424</i>	Nm	
CSR10	<i>alr4167::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR11	<i>all1284::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR13a	<i>all3028::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR17	<i>alr4164::pRL424</i>	Nm	
CSS6-R17	<i>natB::C.S3 alr4164::pRL424</i>	Sm Sp Nm	
CSX60-R8b	<i>natA::C.S3 alr4166::pRL424</i>	Sm Sp Nm	
CSX60-R10	<i>natA::C.S3 alr4167::pRL424</i>	Sm Sp Nm	
CSR21	<i>alr4167-gfp::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR22	<i>alr4167-gfp::pCSV3 bgtB::C.K3</i>	Sm Sp Nm	
CSR23	<i>alr4167-gfp::pCSV3 alr4166::pRL424</i>	Sm Sp Nm	
CSR24	<i>alr2355::pCSV3</i>	Sm Sp	
CSR25	<i>hetR</i> S179N <i>alr2355::pCSV3</i>	Sm Sp	

2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo.

Todas las estirpes de *Anabaena* sp. empleadas en este trabajo se cultivaban fotoautotróficamente en condiciones axénicas en medio BG11_o (Rippka *et al.*, 1979), el cual consta de Na₂CO₃ 0,2 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,24 mM, K₂HPO₄ 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM, citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg/l, Na₂-EDTA 2,4 μM, H₃BO₃ 46 μM, MnCl₂ 9,1 μM, Na₂MoO₄ 1,6 μM, ZnSO₄ 0,8 μM, CuSO₄ 0,3 μM y CoCl₂ 0,2 μM. Este medio se utilizaba para cultivos en condiciones diazotróficas.

Los medios de cultivo se preparaban a partir de un concentrado (100x) que contenía todos los componentes excepto K₂HPO₄, que se añadía al medio antes de proceder a su esterilización. Como fuente de nitrógeno combinado se podía añadir NaNO₃ a una concentración final de 17,6 mM,

denominándose entonces el medio BG11, o NH_4Cl a una concentración final de 4 u 8 mM, denominándose el medio BG11₀ NH_4^+ . En este último caso, el medio se tamponaba mediante la adición de TES-NaOH (pH 7,5), a concentración doble de la de NH_4Cl . Las disoluciones de NH_4Cl y TES se esterilizaban mediante filtración y se añadían al medio después de que éste hubiera sido esterilizado en autoclave. Opcionalmente, los medios BG11₀ y BG11 se suplementaban con NaHCO_3 10 mM, recibiendo entonces las denominaciones BG11₀C y BG11C, respectivamente.

Los cultivos se incubaban en una cámara termostatzada a 30 °C, en matraces Erlenmeyer de 100 mL (conteniendo 50 mL de medio de cultivo) o 50 mL (conteniendo 25 mL de medio de cultivo) de capacidad, con agitación continua (90 rpm) e iluminación superior con luz blanca ($75 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), o bien en tubos de 70 mL (conteniendo 50 mL de medio de cultivo), en cilindros de 240 mL (conteniendo 150 mL de medio de cultivo) o en frascos de 1 L (conteniendo 900 mL de medio de cultivo) de capacidad, con iluminación lateral con luz blanca ($50\text{-}150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En los casos de tubos, cilindros o frascos, los cultivos se burbujeaban con una mezcla estéril de aire y CO_2 en proporción 99:1 que, además de enriquecer en CO_2 , permitía una correcta aireación y agitación de los mismos. En adelante nos vamos a referir a los cultivos gaseados con aire y CO_2 al 1% y suplementados con NaHCO_3 10 mM como cultivos con alto aporte de carbono.

Para cultivos en cajas de Petri, el medio se solidificaba con Bacto-Agar (Laboratorios Difco) al 1% (p/v), esterilizado en autoclave separadamente de los nutrientes y mezclado con los mismos antes de ser vertido en las cajas. Los cultivos en cajas de Petri se incubaban a 30 °C con iluminación superior con luz blanca ($25\text{-}50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Cuando se requería la adición de antibióticos al medio de cultivo, éstos se suplementaban a una concentración final de $10\text{-}20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio líquido y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio sólido para neomicina (Nm); $5\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tanto en medio líquido como sólido para estreptomomicina (Sm) y espectinomomicina (Sp), y $5\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio líquido y $10\text{-}20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio sólido para eritromicina (Em). Los antibióticos se esterilizaban por filtración.

Para comparar la capacidad de crecimiento de diferentes estirpes de *Anabaena* sp. inoculando gotas a partir de suspensiones celulares en cajas de Petri, era muy importante homogeneizar correctamente las suspensiones celulares antes de depositarlas en las cajas.

2.1.1.3. Determinación de tasas de crecimiento.

Para determinar las tasas de crecimiento de distintas estirpes de *Anabaena* sp. en medios con nitrato o sin nitrógeno combinado, éstas se cultivaban inicialmente en medio BG11, suplementado con los antibióticos pertinentes en el caso de las estirpes mutantes. Las células de dichos cultivos se recogían como se indica en el apartado 2.1.1.4, se lavaban con medio BG11₀ y se resuspendían en un pequeño volumen del mismo medio, empleándose esta suspensión celular para inocular, a razón de $0,2 \mu\text{g}$ de $\text{Chl}\cdot\text{mL}^{-1}$, matraces de 50 mL de capacidad con 25 mL de medio BG11₀ o BG11, que se incubaban en condiciones de cultivo. Tras distintos tiempos de incubación se tomaban y congelaban muestras de 200 μL de estos cultivos, previa homogenización de los mismos con ayuda de una jeringa de 5 mL con una aguja de 0,8 mm de diámetro. La cantidad de proteína de dichas muestras se determinaba como se describe en el apartado 2.7.1.

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

2.1.1.4. Recogida y lavado de células.

Las células de los cultivos de *Anabaena* sp. se recogían, dependiendo del volumen de cultivo, mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrifugadora *Megafuge 1.0* (Heraeus Sepatech), a 4.000 g durante 1-10 min, para volúmenes entre 5 y 100 mL, o para volúmenes mayores, mediante centrifugación a temperatura ambiente o a 4 °C en una centrifugadora *Avanti™ J-25* (Beckman Coulter) utilizando el rotor JLA 16.250 a 5.400 g durante 5 min, o bien mediante filtración, en filtros de nitrocelulosa Millipore HAWP de 0,45 µm de diámetro de poro. Cuando se necesitaba procesar las células, tras ser concentradas en volúmenes inferiores a 1,5 mL, se centrifugaban a 14.100 g a temperatura ambiente en una microcentrífuga Eppendorf *MiniSpin plus* o en una centrífuga Eppendorf refrigerada modelo 5402 ó 5415 R a 16.100 g a 4 °C.

Cuando se requería transferir las células a tampones o medios suplementados con una fuente de nitrógeno diferente de la utilizada para su cultivo previo, las células se recogían mediante centrifugación, se lavaban al menos 2 veces con tampón o medio fresco carente de nitrógeno combinado (BG11₀ o BG11₀C) y se resuspendían en el tampón o los nuevos medios a la concentración celular deseada.

2.1.2. *Escherichia coli*.

2.1.2.1. Estirpes empleadas.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y las características más relevantes de sus genotipos se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5α	F ⁺ supE44 Δ(lacZYA-argF)U169 (Φ80lacZΔM15) hdsR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) recA1 endA1 gyra96 (Nal ^r) thi-1 relA1	Hanahan, 1983
ED8654	F ⁺ mcrA1 lac-3 o lacY1 galK2 galT22 supE44 supF58 metB1 hsdR514 (r _k ⁻ m _k ⁻) recA56 trpR55	Murray et al., 1977
HB101	F ⁺ supE44 hsdS20 (r _b ⁻ m _b ⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Str ^r) xyl-5 mtl-1 mcrB leuB6 thi-1 Δ(gpt-proA)62 Δ(mcrC-mrr)	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969

2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo.

Las distintas estirpes de *E. coli* utilizadas se cultivaban en medio rico Luria-Bertani (LB), el cual se compone de NaCl a 10 g·L⁻¹, bacto triptona a 10 g·L⁻¹ y extracto de levadura a 5 g·L⁻¹ (Sambrook et al., 1989). Para la preparación de medio sólido, el medio LB se suplementaba con agar al 1,5% (p/v), y tanto el medio líquido como el sólido se esterilizaban en autoclave.

En el caso de los cultivos líquidos se utilizaban tubos de 10 mL de capacidad conteniendo 3-5 mL de medio, que se incubaban en agitadores orbitales a 200 rpm y 37 °C. Los cultivos en medio sólido se realizaban en cajas de Petri y se incubaban a 37 °C.

Las células competentes DH5α eran preparadas por el Dr. José Enrique Frías, del Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (CICIC). Para la preparación de las mismas se utilizaba medio SOB (Hanahan, 1983; Sambrook et al., 1989), compuesto por bacto triptona a 20 g·L⁻¹, extracto de levadura a 5 g·L⁻¹, NaCl a 0,5 g·L⁻¹ y KOH para ajustar el pH a 7,5. Una vez esterilizado el medio, se añadía MgSO₄ a una concentración final de 20 mM.

Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; kanamicina (Km), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; cioramfenicol (Cm), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$; Sm, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$; Sp, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.1.2.3. Recogida y lavado de células.

Las células de los cultivos de *E. coli* se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente en una microcentrífuga Eppendorf modelo *Minispin plus* a 14.100 g durante 1 min, o bien a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en una centrífuga Eppendorf refrigerada modelo *5402 ó 5415 R* a 16.100 g durante 1 min.

2.2. Determinación de actividades de transporte.

2.2.1. Ensayos de transporte de aminoácidos.

Células cultivadas en medio líquido BG11, BG11C, BG11_o o BG11_c, suplementado con los antibióticos correspondientes en el caso de los mutantes sólo en los medios con nitrato, se recogían y lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), como se indica en el apartado 2.1.1.4, y se resuspendían en el mismo tampón. Los ensayos se llevaban a cabo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en tubos colocados en un baño de paredes transparentes para permitir la iluminación de los mismos con luz blanca procedente de lámparas fluorescentes, $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El ensayo se iniciaba mezclando 1 mL de suspensión celular (conteniendo 3-10 μg de Chl) con 100 μL de una disolución en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) del aminoácido para el cual se quería determinar la actividad de transporte. Los aminoácidos utilizados como sustrato eran L-[U- ^{14}C]aminoácidos ($102\text{-}489 \mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$; GE Healthcare, American Radiolabeled Chemicals), excepto en el caso de la L-Met, que era L-[1- ^{14}C]Met ($50 \mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$; American Radiolabeled Chemicals), a una concentración de 110 μM , quedando a 10 μM en el ensayo. El volumen total de reacción era de 1,1 mL. Tras un tiempo de incubación de 10 min, se tomaba una muestra de 1 mL que se filtraba a través de un filtro de nitrocelulosa Millipore HAWP de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro y se lavaba con 5-10 mL de tampón Tricina-NaOH 5 mM (pH 8,1) (excepto que se indique otra cosa). Los filtros se introducían en viales a los que se añadían 5 mL de líquido de centelleo *Ready Protein⁺*™ (Beckman Coulter), y la radiactividad se determinaba en un contador de centelleo líquido Beckman *LS6000IC*. Como blanco se utilizaba la radiactividad retenida por una suspensión de células hervidas procesadas de la misma manera. En los casos en los que se realizaban ensayos de transporte con metilamina o urea el procedimiento era idéntico, sustituyendo los aminoácidos por alguno de estos dos sustratos.

Para los ensayos de competencia se añadía, además, 10 μL de una disolución en agua desionizada de alta calidad conteniendo un L-aminoácido o Gly no radiactivos a concentraciones de 11,1 mM y 111 mM, quedando a 100 μM y 1 mM en el ensayo, respectivamente, salvo para L-triptófano y L-tirosina, que presentaban problemas de solubilidad en agua y se preparaban a concentraciones distintas. Para L-Trp se añadían 25 μL de una disolución en agua desionizada de alta calidad a concentraciones de 4,5 mM y 45 mM, quedando a 100 μM y 1 mM en el ensayo, respectivamente, mientras que para L-Tyr se añadían 0,9 mL de una disolución en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) a concentraciones de 222 μM y 2,22 mM, quedando a 100 μM y 1 mM en el ensayo, respectivamente. Cuando se añadía L-Tyr el volumen final del ensayo era de 2 mL, por lo que los L-[U- ^{14}C]aminoácidos utilizados como sustrato se añadían a una concentración de 200 μM , quedando a 10 μM en el ensayo, mientras que para el resto de aminoácidos se utilizaban L-[U- ^{14}C]aminoácidos a una concentración de 111 μM para dar una concentración final de 10 μM . En todos los casos las células se añadían en último lugar, momento en el que se iniciaba el ensayo.

Para los ensayos de transporte de aminoácidos con heterocistos aislados como se indica en el apartado 2.5, éstos se lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) y se resuspendían en el mismo tampón. Los ensayos se realizaban a 30 °C con luz blanca procedente de lámparas fluorescentes, $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El ensayo se iniciaba mezclando 1 mL de suspensión de heterocistos (conteniendo 50-200 μg de proteína) con 100 μL de una disolución en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) del aminoácido para el que se quería determinar la actividad de transporte a una concentración de 11 μM , quedando a 1 μM en el ensayo, y se procedía como en los ensayos con filamentos enteros. Como blanco se utilizaba la radiactividad retenida por una suspensión de heterocistos hervidos procesados de la misma manera.

2.2.2. Ensayos de transporte de ácidos carboxílicos:

Células cultivadas en medio líquido BG11 o BG11₀, suplementado con los antibióticos correspondientes 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 2.1.1.4, y se resuspendían en el mismo tampón. Los ensayos se llevaban a cabo a 30 °C en tubos colocados en un baño de paredes transparentes para permitir la iluminación de los mismos con luz blanca procedente de lámparas fluorescentes, $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El ensayo se iniciaba mezclando 0,6 ó 0,9 mL de suspensión celular (conteniendo 3-10 μg de Chl·mL⁻¹) con 100 μL de una disolución conteniendo [1-¹⁴C]piruvato (23-28 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$; GE Healthcare) a diferentes concentraciones en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), quedando a 0,44, 4,4, 44 y 85 μM en el ensayo. El volumen total de reacción era de 0,7 ó 1 mL y el tiempo de incubación era de 10 min, tomándose a 1, 3 y 10 min muestras de 200 ó 300 μL , respectivamente, que se procesaban como en el caso de los ensayos de transporte de aminoácidos.

Para los ensayos de competencia se empleaban células cultivadas en medio líquido BG11, suplementado con los antibióticos correspondientes en el caso de las estirpes mutantes, y los ensayos se llevaban a cabo mezclando 870 μL de suspensión celular (conteniendo 3-10 μg de Chl·mL⁻¹) con 25,5 μL de una disolución de [1-¹⁴C]piruvato (23-28 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$; GE Healthcare) 1.765 μM en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), quedando en el ensayo a 50 μM . Además, se añadían 4,5 μL de tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) con un ácido carboxílico no radiactivo a concentraciones de 10 mM y 100 mM, quedando a 50 y 500 μM en el ensayo, respectivamente. Por otra parte, también se llevaron a cabo estos ensayos mezclando 3,3 mL de suspensión celular (conteniendo 3-10 μg de Chl·mL⁻¹) con 9,3 μL de una disolución de [1-¹⁴C]piruvato (23-28 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$; GE Healthcare) 1.787,5 μM en tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), quedando en el ensayo a 5 μM , añadiendo, además, 16,5 μL de tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) conteniendo un ácido carboxílico no radiactivo a concentraciones de 1 mM y 10 mM, quedando a 5 y 50 μM en el ensayo, respectivamente. Los ácidos carboxílicos utilizados para los ensayos de competencia eran piruvato sódico, 2-oxo-3-metilvalerato sódico, 2-oxoisocaproato sódico, 2-oxobutirato sódico, 2-oxoisovalerato sódico (Sigma-Aldrich) y ácido 2-oxovalérico (Fluka [Sigma-Aldrich]). En todos los casos se iniciaba el ensayo por adición de las células en último lugar. El volumen total de reacción era de 900 μL ó 3,33 mL y el tiempo de incubación era de 10 min, tomándose a 1, 3 y 10 min muestras de 250 μL ó 1 mL, respectivamente.

2.3. Ensayos de catabolismo de alanina.

Células cultivadas en frascos de 1 L con 900 mL de medio BG11C (suplementado con antibióticos en el caso de las estirpes mutantes) se recogían y lavaban por filtración con medio BG11₀C, como se indica en el apartado 2.1.1.4, y se utilizaban para inocular frascos de 1 L con 900 mL de medio BG11₀C, que se

incubaban con gaseo de aire:CO₂ (99:1) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, las células se recogían por centrifugación a temperatura ambiente, se lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), como se describe en el apartado 2.1.1.4, y se resuspendían en un pequeño volumen del mismo tampón. A un volumen de 1,1 mL de dicha suspensión de células, conteniendo 10 µg de Chl·mL⁻¹, se le añadía L-[U-¹⁴C]Ala (158 µCi·µmol⁻¹; GE Healthcare) a una concentración final en el ensayo de 3 µM, y la mezcla resultante se incubaba a 30 °C durante 10 y 60 min con iluminación con luz blanca procedente de lámparas fluorescentes a 200 µE·m⁻²·s⁻¹. Transcurrido el tiempo de incubación, las células contenidas en 1 mL de muestra se recogían mediante filtración en un filtro de nitrocelulosa Millipore HAWP de 0,45 µm de diámetro de poro y se lavaban con 5-10 mL de tampón Tricina-NaOH a 5 mM (pH 8,1). 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 a temperatura ambiente a 1.400 g durante 5 min 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 desionizada de alta calidad. Alícuotas de 5 µL de las muestras así generadas se sometían posteriormente a cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*; véase el apartado 2.4.1).

2.4. Determinación de metabolitos.

2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC).

Las muestras a analizar (5 µL de las disoluciones radiactivas obtenidas en los ensayos de catabolismo de Ala) se aplicaban a placas de capa fina de 0,1 mm de celulosa de 20 cm x 20 cm (Merck, producto número 1.05716.0001), en las que se sometían a una separación bidimensional. 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). Para la detección de las manchas radiactivas, las placas se analizaban en un contador de radiación β bidimensional *Instant Imager* (Packard) utilizando el programa de análisis de imágenes *Packard Imager 1.05*, y en un aparato *Cyclone® Storage Phosphor System* utilizando el programa de análisis de imágenes *OptiQuant™ 5.0* (PerkinElmer). La identificación de algunos aminoácidos 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. Esta 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).

2.4.2. Determinación de aminoácidos no radiactivos.

Células procedentes de cultivos con gaseo de aire:CO₂ (99:1) en medio líquido BG11C, suplementado con los antibióticos correspondientes en el caso de los mutantes, se recogían y lavaban con medio BG11₀C, como se indica en el apartado 2.1.1.4, y se utilizaban para inocular tubos de 70 mL con 50 mL de medio BG11₀C, que se incubaban con gaseo de aire:CO₂ (99:1) durante 48 horas. A las 24 y 48 horas se tomaban muestras de 10 mL que se filtraban, congelándose el medio extracelular filtrado. También se tomaban muestras de 0,2 mL de los cultivos para la determinación de la cantidad total de proteína (véase el apartado 2.7.1) o de 0,5-1 mL para la determinación de la cantidad total de clorofila (véase el apartado 2.7.3). Las muestras del medio extracelular se liofilizaban y se resuspendían con 250 ó 500 µL de HCl 0,1 M, concentrándose 40 ó 20 veces, respectivamente. Los aminoácidos presentes en las

muestras se analizaban mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *High-Performance Liquid Chromatography*).

2.4.3. Determinación de aminoácidos mediante HPLC.

El análisis de las muestras de los medios extracelulares mediante HPLC fue realizado por la Dra. Rocío Rodríguez y Carlos Parejo, del Servicio de Cromatografía del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Para la determinación de aminoácidos, se utilizó un método basado en la derivatización de los mismos con fenilisotiocianato (PITC) (Heinrikson y Meredith, 1984), que se une a aminas primarias y secundarias generando un derivado feniltiocarbamil que absorbe luz a 254 nm. Para ello, se tomaban 40 ó 100 μL de cada muestra, que se mezclaban con 60 μL de la disolución derivatizante (etanol:agua:trietanolamina:PITC, 7:1:1:1), se incubaba a temperatura ambiente durante 30 min y se secaba bajo un flujo de gas N_2 . Como paso final, el precipitado se resuspendía con 40 ó 100 μL , respectivamente, de tampón fosfato sódico 4 mM (pH 7,4) y acetonitrilo al 2% (v/v). 10 μL de la disolución resultante se inyectaban en un sistema de HPLC *Waters™ LC Module I plus* (Waters) o *LaChrom Elite®* (Hitachi High Technologies America), equipados con una bomba que permite hacer gradientes, un inyector automático y un detector de absorbancia. La separación se realizaba a 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 46 °C en un cartucho de acero en fase reversa, *LiChroCART® C₁₈* de 3,9 mm x 15 cm, precedido de una precolumna de 3,9 mm x 4,0 cm rellena del mismo material. Para la carrera se utilizaban las siguientes disoluciones: solvente A, tampón acetato sódico 70 mM (pH 6,55) y acetonitrilo al 2% (v/v); solvente B, acetonitrilo al 50% (v/v). Se utilizaba un gradiente tipo 7 (Waters *LC Module I plus*), que es ligeramente convexo, o un gradiente discontinuo (Hitachi *Elite LaChrom®*).

Para calibrar el aparato se utilizaba una mezcla de aminoácidos de composición y concentración conocidas (disolución estándar de aminoácidos *AA-S-18* de Sigma). Los cromatogramas generados por el aparato se analizaban utilizando los programas Informáticos *Millenium³² 4.00* (Waters™ *LC Module I plus*) o *EZChrom Elite™ 3.1.7* (Hitachi *LaChrom Elite®*). Los aminoácidos detectables mediante este método eran Asp, Glu, Gln, Asn, Ser, Gly, His, Thr, Ala, Arg, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu, Phe y Lys.

2.5. Aislamiento de heterocistos de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se siguió el método descrito por Häger *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Se partía de cultivos de 500-900 mL en medio BG11C gaseados con aire:CO₂ (99:1). Una vez que habían alcanzado la fase exponencial de crecimiento (3-5 μg de Chl·mL⁻¹), las células se recogían mediante filtración (véase el apartado 2.1.1.4), se lavaban y se incubaban en medio sin nitrógeno combinado gaseando con aire:CO₂ (99:1) durante 18 h, momento en el que se observaba la presencia de heterocistos maduros con una frecuencia aproximada de 1 heterocisto por cada 10-15 células vegetativas. Entonces, los filamentos se recogían por filtración (véase el apartado 2.1.1.4) y se resuspendían en 10-15 mL de un tampón de rotura que contenía imidazol 50 mM (pH 7,5) y EDTA 0,5 mM. Posteriormente, la suspensión de células se sometía a dos ciclos de rotura en una prensa de French (SLM-AMINCO) a 3.000 p.s.i., y el lisado celular se centrifugaba a 200 g y 4 °C durante 10 min en una centrifugadora *Avanti™ J-25* o *Avanti® J-26 XP* (Beckman Coulter), utilizando el rotor JA-25.50. Mediante este procedimiento, se rompían los filamentos separando las células vegetativas de los heterocistos, quedando las primeras en el sobrenadante y los segundos en el precipitado. Para obtener una suspensión de heterocistos libre de células vegetativas el precipitado con los heterocistos se resuspendía en el mismo tampón y se lavaba tres veces, centrifugando a 200 g y 4 °C durante 10 min. El pellet obtenido finalmente se resuspendía en

tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1) y la suspensión de heterocistos resultante se utilizaba inmediatamente para los ensayos de transporte de aminoácidos.

2.6. Determinación de la actividad alanina deshidrogenasa.

Las células de cultivos de 900 mL conteniendo $5-10 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ se recogían por centrifugación a 4°C (véase el apartado 2.1.1.4) y, posteriormente, se resuspendían en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM y β -mercaptoetanol 5 mM, añadiéndole a continuación el inhibidor de proteasas PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro; Sigma) a una concentración final de 1 mM. Posteriormente, la suspensión celular se sometía a tres ciclos de rotura en una prensa de French (SLM-AMINCO) a 20.000 p.s.i. y el lisado celular se centrifugaba a 35.000 g durante 20 min y a 4°C en una centrífuga *Avanti® J-26 XP* (Beckman Coulter), rotor JA-25.50, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido constituía el extracto libre de células, que se empleaba inmediatamente para la determinación de la actividad alanina deshidrogenasa (AlaDH).

La actividad AlaDH se medía tal como se describe en Rowell y Stewart (1975). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 mL, una cantidad variable del extracto de interés (0,1-0,5 mg de proteína) en tampón de ensayo Tris-HCl, 100 mM (pH 8,0), piruvato sódico, 1 mM, y NH_4Cl , 133,3 mM. La reacción se llevaba a cabo a temperatura ambiente y se iniciaba añadiendo NADH a concentración 100 μM , momento a partir del cual se monitorizaba el consumo de NADH durante 5 min, determinándose la $A_{340\text{nm}}$ en un espectrofotómetro *Biomate 5* (Thermo). Como control se utilizaban mezclas de reacción en las que el piruvato sódico, el NH_4Cl o el extracto crudo se sustitúan por H_2O de alta pureza.

2.7. Determinación de parámetros celulares.

2.7.1. Determinación de la cantidad de proteína de suspensiones celulares.

La cantidad de proteína presente en las suspensiones celulares se determinaba siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951), con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). A 200 μL de muestra se le añadían 50 μL de NaOH 0,5 N y 750 μL de una mezcla, en una proporción 100:1, de las disoluciones A y B, cuyas composiciones se especifican a continuación. La disolución A estaba compuesta por Na_2CO_3 al 2% (p/v), NaOH al 0,4% (p/v), tartrato sódico-potásico al 0,16% (p/v) y SDS al 1% (p/v); la disolución B consistía en $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4% (p/v). Tras agitación con vórtex e incubación a 37°C durante 5 min, se añadían 75 μL de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido con agua desionizada de alta calidad (1:1; v/v), se agitaba y se incubaba de nuevo durante 5 min a 37°C . A continuación, se determinaba la absorbancia a 750 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

2.7.2. Determinación de la cantidad de proteínas de heterocistos aislados.

La cantidad de proteína presente en las suspensiones de heterocistos aislados se determinaba mediante el método comercial *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad). A muestras de 6 μL de suspensión se le añadían 54 μL de tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), el mismo en el que se encontraban resuspendidos los heterocistos (véase el apartado 2.5). A las muestras de 60 μL se le añadían 150 μL de Reactivo A y se agitaban con vórtex durante 5 s, tras lo cual se añadían 1,2 mL de Reactivo B y se incubaba a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se determinaba la absorbancia a 750

nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

2.7.3. Determinación de la cantidad total de clorofila.

El contenido de clorofila *a* (Chl) de las suspensiones celulares se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Un volumen de suspensión celular de 50-200 μl , conteniendo un máximo de 60 μg de Chl, se mezclaba con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrifuga y, tras agitación vigorosa durante 1 min, la suspensión resultante se centrifugaba a 14.100 *g* durante 1 min. La concentración de Chl en el sobrenadante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon = 74,46 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{m}\cdot\text{cm}^{-1}$. Todas las muestras se tomaban por duplicado. La cantidad de células que contiene 1 μg de Chl contiene aproximadamente 25-30 μg de proteína.

2.8. Aislamiento y análisis de DNA.

2.8.1. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se relacionan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Resistencia	Características relevantes	Referencia
Plásmidos no generados en este trabajo			
pCSEL21	Ap	Plásmido que contiene una fusión traduccional <i>ntcA-gfp</i> entre los sitios <i>Cfa</i> I y <i>Pst</i> I del vector pIC20R.	Olmedo-Verd <i>et al.</i> , 2006
pCSV3	Sm Sp	Plásmido derivado del vector pRL500 (Elhai y Wolk, 1988b), en el que el gen de resistencia a Ap ha sido escindido con <i>Dra</i> I y reemplazado por la casete de resistencia C.S3.	Virginia Rodríguez, sin publicar
pGEM-T	Ap	Vector empleado para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR.	Promega
pGEM-T Easy	Ap	Vector empleado para la clonación de productos de PCR.	Promega
pMBL-T	Ap	Vector empleado para la clonación de productos de PCR.	Dominion
pRL424	Cm Km	Vector para la selección positiva de plásmidos recombinantes.	Elhai y Wolk, 1988b
pRL443	Ap Tc	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Elhai y Wolk, 1988a
pRL623	Cm	Derivado de ColK portador de <i>mob</i> y genes de metilasas de sitios <i>Ava</i> I, <i>Eco</i> 47 II (isoesquizómero de <i>Ava</i> II) y <i>Eco</i> T22 I (isoesquizómero de <i>Ava</i> III).	Elhai <i>et al.</i> , 1997
Plásmidos generados en este trabajo			
pCSR1	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>all0342</i> clonado en el vector pGEM-T.	
pCSR3	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>all2912</i> clonado en el vector pGEM-T.	
pCSR4	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr2536</i> clonado en el vector pGEM-T.	
pCSR5	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr3027</i> clonado en el vector pGEM-T.	
pCSR6	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr4166</i> clonado en el vector pGEM-T.	
pCSR1.1	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR5 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.	

pCSR12	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR6 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR13	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR1 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR15	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR3 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR16	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR6 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR17	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR4 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR18	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR5 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR20	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>all2911</i> clonado en el vector pGEM-T Easy.
pCSR24	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR20 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR35	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr4167</i> clonado en el vector pGEM-T Easy.
pCSR36	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>all1284</i> clonado en el vector pGEM-T Easy.
pCSR39	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR35 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR43	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR35 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR44	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR36 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR47	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>all3028</i> clonado en el vector pGEM-T Easy.
pCSR51	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr4164</i> clonado en el vector pGEM-T Easy.
pCSR56	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR47 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR60	Km	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR51 clonado en el vector pRL424 digerido con <i>Bam</i> H I.
pCSR70	Ap	ORF <i>alr4167</i> clonada en el vector pMBL-T.
pCSR73	Ap	Fragmento <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V del plásmido pCSR70 clonado en el plásmido pCSEL2.1 digerido con <i>Cla</i> I- <i>Eco</i> R V.
pCSR79	Sm Sp	Fragmento <i>Eco</i> R I del plásmido pCSR73 clonado en orientación inversa con respecto a la casete C.S3 del vector pCSV3, digerido con <i>Eco</i> R I.
pCSR80	Ap	Fragmento interno de la ORF <i>alr2355</i> clonado en el vector pMBL-T.
pCSR88	Sm Sp	Fragmento <i>Bam</i> H I del plásmido pCSR80 clonado en el vector pCSV3 digerido con <i>Bam</i> H I.

[†]Resistencia a los antibióticos indicados.

2.8.2. Aislamiento de DNA.

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

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se empleó el método basado en la lisis alcalina de las células (Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook y Russell, 2001). Las células contenidas en 3 mL de cultivo se recogían en tubos de microcentrífuga, mediante centrifugación a 14.100 *g* durante 1 min, y se resuspendían en 100 μ L de disolución I (Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], glucosa 50 mM y EDTA 10 mM). A continuación se añadían 200 μ L de disolución II (NaOH 0,2 M y SDS al 1% [p/v]) y se agitaba brevemente invirtiendo los tubos, provocando con ello la lisis celular. Se añadían entonces 150 μ L de disolución III

(acetato potásico 3 M [pH 4,8]), se homogenizaba agitando suavemente con los tubos boca abajo, se incubaba en hielo durante 5 min y se centrifugaba a 16.100 g durante 5 min a 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) y después a otra con 1 volumen de cloroformo, separándose las fases en ambas extracciones mediante centrifugación a temperatura ambiente a 16.100 g durante 2 min. La fase acuosa resultante se precipitaba con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h, -20 °C). Tras centrifugar las muestras (16.100 g, 15-20 min, 4 °C), el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba en un flujo de aire durante 20-30 min y se resuspendía en 15-30 μl de agua desionizada de alta calidad o tampón $T_{1/10}E$ (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM [pH 8]).

Para el aislamiento de DNA plasmídico de alta calidad, utilizado para secuenciación, se empleaba el sistema comercial *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), el cual está basado también en la lisis alcalina de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias.

El DNA total de *Anabaena* sp. se aislaba siguiendo el método descrito por Cai y Wolk (1990). Para ello, células procedentes de 25-50 mL de cultivo se recogían mediante centrifugación y se resuspendían con 400 μl de $T_{1/10}E$ (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0] y EDTA 0,1 mM). A la suspensión celular resultante se le añadían 150 μl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro, previamente lavadas con ácido nítrico y agua destilada, y esterilizadas a 180 °C), 20 μl de SDS al 10% (p/v) y 450 μl de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1; v/v). La mezcla resultante se sometía a 4-8 ciclos de agitación con vórtex durante 1 min e incubación en hielo durante 1 min. Posteriormente, el lisado se centrifugaba a 16.100 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante resultante 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, separándose las fases en todas las extracciones mediante centrifugación (16.100 g, 2 min, 4 °C). Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa final se precipitaban mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h, -20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y posterior centrifugación a 16.100 g durante 15 min a 4 °C. Tras centrifugar las muestras, el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba en un flujo de aire durante 20-30 min y se resuspendía con 30 μl de agua desionizada de alta calidad o tampón $T_{1/10}E$.

2.8.3. Estimación de la concentración de DNA.

La concentración de DNA de las muestras se estimaba por comparación con muestras de concentración conocida. Para ello, alícuotas de la muestra problema o de diluciones de la misma se sometían a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio (véase el apartado siguiente), utilizando como patrón de tamaño y carga una cantidad conocida de DNA del fago λ digerido con la endonucleasa *Cla* I, o bien el marcador de tamaño comercial *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche), que se resolvían simultáneamente en el mismo gel.

2.8.4. Separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM [pH 8,0]) diluido al 50%. La concentración de agarosa de los geles variaba entre 0,6% y 1,2% (p/v), dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos que se quisieran resolver. Las muestras que contenían RNA 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 al 50% (v/v), azul de bromofenol al 0,4% (p/v) y xileno-cianol FF al 0,4% (p/v). Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleaban como patrón los fragmentos de DNA del fago λ digerido con la endonucleasa *Cla* I. Para la detección del DNA se añadía bromuro de etidio a los geles a una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ó 1,5 μL de *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) para 50 mL de gel. La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos Pharmacia, modelos *GNA-100* ó *GNA-200*, o Bio-Rad, modelos *Mini-Sub® Cell GT* o *Wide Mini-Sub® Cell GT*. El DNA se visualizaba iluminando los geles con un transiluminador de luz ultravioleta Bio-Rad *Gel-Doc™ XR* con el software Bio-Rad *Quantity One® 4.6.2* y una impresora videográfica Sony UP-D897.

2.8.5. Purificación de fragmentos de DNA embebidos en geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis se extraían de los geles de agarosa siguiendo uno de los procedimientos que se detallan a continuación.

2.8.5.1. Procedimiento del juego de reactivos *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

La extracción mediante este procedimiento se basa en la solubilización de la agarosa con acetato y posterior captura del DNA en una columna GFX. Para llevarla a cabo, el trozo de gel conteniendo el DNA a aislar se separaba del resto y se trataba siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.8.5.2. Procedimiento del juego de reactivos *GeneClean® II* (BIO).

La extracción mediante este procedimiento se basa en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI a 6 M y la unión del DNA a perlas de vidrio. Para llevarla a cabo, el trozo de gel conteniendo el DNA a aislar se cortaba y se trataba siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.5.3. Congelación y presión.

La extracción mediante este procedimiento se basa en la congelación del trozo de agarosa conteniendo el DNA a -20 °C en el interior de una jeringa y extracción de la fase líquida por presión. La fase líquida así obtenida se sometía después a una extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1; v/v) y a otra con 1 volumen de cloroformo, separándose las fases en ambas extracciones por centrifugación (16.100 g, 2 min, temperatura ambiente). El DNA se precipitaba de la fase acuosa resultante con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h, -20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) por centrifugación a 16.100 g durante 15-20 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70% (v/v) y, tras secar en un flujo de aire durante 10-15 min, se resuspendía con 10-15 μL de agua desionizada de alta calidad o tampón $T_{1/10}E$ (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM [pH 8,0]).

2.8.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación en filtro con sondas radiactivas (análisis de Southern).

2.8.6.1. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nailon.

El DNA digerido con la enzima de restricción deseada se sometía a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% (p/v). Una vez resueltos los fragmentos de DNA, éstos se transferían a filtros de nailon (*Hybond™-N+* [GE Healthcare] o *GeneScreen Plus®* [PerkinElmer]) como se describe en Ausubel *et al.*

(2009). Para ello, el gel se sumergía en una disolución de HCl 0,25 N y se mantenía con agitación suave durante 20-30 min para hidrolizar parcialmente el DNA y facilitar así su transferencia, se lavaba varias veces con agua destilada y, a continuación, el DNA se transfería por capilaridad a la membrana de nailon en condiciones alcalinas durante 12-15 h usando como vehículo de transferencia una disolución de NaOH a 0,4 N. Terminada la transferencia, la membrana se lavaba con SSPE 2x (véase el apartado siguiente) y se dejaba secar para permitir la fijación del DNA.

2.8.6.2. Hibridación de DNA con sondas radiactivas.

La hibridación con sondas radiactivas del DNA fijado a filtros de nailon se llevaba a cabo utilizando una disolución de prehibridación e hibridación compuesta de SSPE 5x, disolución Denhardt 5x, SDS al 0,5% (p/v) y DNA de esperma de salmón o arenque desnaturalizado a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El DNA de esperma se desnaturalizaba previamente mediante incubación a 100°C durante 5 min, seguido de un enfriamiento inmediato en hielo durante 3 min. Las disoluciones de partida utilizadas eran SSPE 20x, que constaba de NaCl 3 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2 M (pH 7,4) y EDTA 0,02 M (pH 7,4), y Denhardt 100x, que contenía ficol al 2% (p/v), polivinilpirrolidona soluble al 2% (p/v) y BSA Fracción V al 2% (p/v).

El filtro de nailon con el DNA fijado se sometía a una prehibridación durante 2-4 h a 65°C con agitación moderada, tras lo cual se añadía la sonda de DNA marcada radiactivamente (véase el apartado 2.8.9.4), previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 min y enfriada inmediatamente en hielo durante 3 min, y se dejaba hibridando durante 12-15 h a 65°C . Tras la hibridación, el filtro se lavaba con agitación moderada durante dos periodos de 15 min a 65°C con una disolución que contenía SSPE 2x y SDS al 0,1% (p/v), y durante 15 min con una disolución de SSPE 1x y SDS al 0,1% (p/v).

2.8.6.3. Detección de la radiactividad.

La detección y el análisis de las áreas radiactivas en los filtros se realizaban mediante autorradiografía electrónica en un detector bidimensional de partículas β *InstantImager* (Packard) o mediante el sistema *Cyclone® Storage Phosphor System* y el programa de análisis de imágenes *OptiQuant™* (PerkinElmer).

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

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se realizaba en un termociclador *Tpersonal* (Biometra). La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 25-50 μL , en una mezcla que contenía 1-5 ng de DNA molde, cada dNTP a concentración 0,2 mM, 20-50 pmol de cada cebador y 1,25-2,5 U de DNA polimerasa con su tampón correspondiente (Tabla 2.4). Como molde para la amplificación se utilizaba el DNA genómico aislado de *Anabaena* sp. o el DNA plasmídico obtenido de *E. coli*, según se indique en cada caso. El resultado de la reacción se analizaba en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.8.4.

El programa utilizado realizaba 30-40 ciclos de los siguientes procesos: desnaturalización del DNA por incubación durante 1 min a 95°C , alineamiento de los cebadores con el DNA molde durante 1 min de incubación a la temperatura más alta permitida por la pareja de cebadores utilizada, siempre que no fuese superior a 65°C (DNA polimerasa Taq) ó 55°C (DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*), y polimerización a 72°C durante un tiempo variable según la velocidad de extensión de la enzima utilizada y el tamaño del fragmento a amplificar. Este conjunto de ciclos iba precedido de una incubación a 95°C durante 3-5 min y finalizaba con una incubación a 72°C durante 10 min.

Tabla 2.4. Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo.

DNA polimerasa (suministrador)	Unidades Reacción	Tampón (1x)	Tiempo de extensión
DNA polimerasa Taq (C.viral)	1,25-2,5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM (pH 8,8), Tween-20 al 0,1% y MgCl ₂ 2 mM	15 s·kb ⁻¹ de DNA
DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> [†]	Desconocido	Tris-HCl 12 mM (pH 8,3), KCl 60 mM, MgCl ₂ 1,8 mM, Tween-20 al 0,004%, gelatina al 0,012%	90 s·kb ⁻¹ de DNA

[†]Preparación no comercial (Engelke *et al.*, 1990).

Las secuencias de los oligodesoxinucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores en las diferentes reacciones de amplificación se especifican en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Desoxioligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3')
all0342-7120-1	GGA TCC GTT GAC CAA TAC CCT CAT GGC
all0342-7120-2	GGA TCC GCT TGG AAG GTT ACA GGC
all1284-7120-3	GGA TCC GGT TAT CGA TGA TAG TGG CAG
all1284-7120-4	GGA TCC CAG AAG CGA ATA GCG GCA G
all1284-7120-5	CTT GCA GCT GTG GGA CTG AC
all1284-7120-6	GGA CGA ATG AGC AAC ACC
all2911-7120-1	GGA TCC CCA AGC GTT CCT GAT TTG C
all2911-7120-2	GGA TCC GTA TGT TGC AGC TGT GCT AC
all2912-7120-1	GGA TCC GGA CTT TTG ACA CCC CAT AC
all2912-7120-2	GGA TCC GCC ATT TCT AAA GCT TTA CGG
all2912-7120-3	CGT CCA TGC AGG ATA CAT C
all2912-7120-4	CTT TCC CTG CGC CTA AG
all3028-7120-1	GGA TCC CTG TGG AAT GTG GTC ATA C
all3028-7120-2	GGA TCC GTT AGC TTC TAC AGT CGC CG
all3028-7120-3	GGT GCA GAA ACC GTT GCC
all3028-7120-4	CAT TAA CCC GAT TCC AGG CG
alr1004-7120-3	CCT CTA GAA GTT CCC TCC
alr1004-7120-4	GTC AGG GTT GGT AGT CTG
alr2355-7120-1	GGA TCC GGA GTC GAG AGT TAG TAG
alr2355-7120-2	GGA TCC CTC TGC GTC CTA GTA CC
alr2355-7120-3	CCA CAA TAC GGA AGT GTC
alr2355-7120-4	GCG TGT AAG GTT TCC AC
alr2536-7120-1	GGA TCC GCT AAC GCT ACT TTG CCG
alr2536-7120-2	GGA TCC GCA ACC CAA AGC CAA TC
alr3027-7120-1	GGA TCC GTG GTG GAC TTG CTT TAG C
alr3027-7120-2	GGA TCC GGT AGT ATC GCA GAC TTG GC
alr3027-7120-3	GAC ACT GGC TTA TGA ATG G
alr3027-7120-4	GCA AAG CCA AAG GGT GG
alr4164-7120-1	GGA TCC GCG GTA TTG ATG TAG ATG
alr4164-7120-2	GGA TCC GCA TCT CCT CTA GCA ACG
alr4166-7120-1	GGA TCC GAC ATG GCG TAA AGT AGG C
alr4166-7120-2	GGA TCC GCT TCA ACT TGT CCA CG
alr4166-7120-3	GAT CGC TTC TAC TTT AGG
alr4166-7120-4	GCG ATA GTA GAG AAG TGT C
alr4167-7120-3	GGA TCC GAA TCG TGG AGA AGT TGT GG
alr4167-7120-4	GGA TCC CCA CTA CCA TTG TCA TAC C
alr4167-7120-5	CAT GTC CTC CAA GGT GTT AG
alr4167-7120-6	GCT GAT TCG ACT AGG TGA C
alr4167-7120-7	CAG GTA TAG CCC GTT CG
alr4167-7120-8	CAC GCA CAT ACA CCA GAG
alr4167-7120-Clal	GAG AGA CAA CTA ATC GAT TAA GTG AAC
alr4167-7120-GFP	GTT TGA TAT CGA GAA TCT GTG
GFP-4	CAA GAA TTG GGA CAA CTC C

En cada secuencia se indica en negrita y subrayada la diana introducida.

2.8.8. Secuenciación del DNA.

Para el análisis rutinario de secuencias de DNA amplificadas por PCR, las muestras se enviaban al servicio de secuenciación automática de DNA de la empresa Secugen S.L. (C/ Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid).

2.8.9. Tratamientos enzimáticos del DNA.

2.8.9.1. Restricción del DNA.

Las endonucleasas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministradas por New England Biolabs, Roche o Amersham, y se utilizaban de acuerdo con las instrucciones de cada fabricante. Las reacciones de restricción de plásmidos se llevaban a cabo a la temperatura recomendada (generalmente 37 °C) durante un tiempo variable (2-15 horas) y se detenían mediante incubación de la mezcla de restricción a 65 °C durante 10 min o, para enzimas termoestables, mediante extracción con 1 volumen de fenol y 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1; v/v) y posterior precipitación del DNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (1 h, -20 °C) y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2). Por otra parte, las restricciones de DNA total de *Anabaena* sp. para análisis de Southern (véase el apartado 2.8.6) se llevaban a cabo con tiempos de incubación prolongados (12-15 h), empleando en general cantidades de enzima no inferiores a 20 U· μg^{-1} de DNA. Las restricciones de plásmidos o preparaciones de DNA total que contuvieran RNA se llevaban a cabo en presencia de 1 μg de RNasa A de páncreas bovino (Roche) previamente tratada como se describe en Sambrook y Russell (2001) para destruir cualquier posible actividad DNasa contaminante.

Para la obtención de mapas de restricción, el DNA se sometía a digestión con las enzimas seleccionadas, y los fragmentos obtenidos se visualizaban mediante electroforesis en geles de agarosa (véase el apartado 2.8.4). Siempre que era posible, se hacía uso de aquellas enzimas para las que había dianas conocidas localizadas asimétricamente.

2.8.9.2. Desfosforilación del DNA.

La eliminación mediante desfosforilación de los grupos fosfato de los extremos 5' de vectores linearizados se llevaba a cabo con el fin de evitar la religación del vector cuando se quería clonar un fragmento de DNA no seleccionable. Para ello, una vez digerido el vector con las enzimas de restricción adecuadas, e inactivadas éstas según se describe en el apartado anterior, el DNA se incubaba durante 30 min a 37 °C en una disolución conteniendo Tris-acetato 10 mM (pH 8,0), acetato magnésico 10 mM y acetato potásico 50 mM con 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Amersham), o bien en Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) y MgCl_2 5 mM con 1 U de fosfatasa alcalina de gamba (Roche), tras lo cual se añadía otra unidad de enzima en los dos casos y se incubaba a 37 °C durante otros 30 min. En ambos casos la reacción se detenía incubando a 65 °C durante 20 min, aunque para inactivar correctamente la fosfatasa alcalina de Intestino de ternera se añadía además EDTA 16 mM. La preparación obtenida se sometía a electroforesis en un gel de agarosa y el plásmido linearizado se purificaba como se describe en el apartado 2.8.5.

2.8.9.3. Ligación del DNA.

Los extremos de los distintos fragmentos de DNA generados tras restricción (y desfosforilación o tratamiento con el fragmento Klenow en su caso) se ligaban mediante un tratamiento con la ligasa de DNA del bacteriófago T4 proporcionada por distintas casas comerciales (Promega, Dominion), empleadas según las indicaciones del fabricante correspondiente. La reacción se llevaba a cabo en un

volumen de 10-15 μl a 15 °C durante 12-15 h, utilizando el tampón 10x suministrado por el fabricante, o a temperatura ambiente durante 3-5 h utilizando el tampón rápido 2x (Promega), o bien a 20-22 °C durante 3-5 h (Dominion), según las instrucciones de cada fabricante. Las moléculas producidas mediante esta reacción se utilizaban para transformar células de *E. coli* DH5 α .

2.8.9.4. Marcaje radiactivo de sondas de DNA.

Los fragmentos de DNA utilizados como sonda para análisis de Southern se generaban por digestión de vectores con el inserto de interés utilizando enzimas de restricción y se marcaban utilizando el juego de reactivos *Ready-to-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP)* (Amersham). Este procedimiento se basa en la extensión a partir de cebadores de secuencia aleatoria, suministrando una mezcla de reacción liofilizada que contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de desoxioligorribonucleótidos de secuencia aleatoria. Aproximadamente 25-100 ng de DNA, previamente desnaturalizado, se incubaban durante 30 min a 37 °C con la mezcla de reacción disuelta en agua desionizada de alta calidad y 25 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3.000 Ci-mmol $^{-1}$; Amersham). Los nucleótidos no incorporados se eliminaban filtrando la muestra a través de una columna de Sephadex G-50.

2.9. Métodos genéticos.

2.9.1. Vectores para la generación de mutantes de *Anabaena* sp. mediante recombinación simple.

Para la generación de mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 interrumpiendo ORFs de interés mediante la inserción de DNA exógeno se procedía, en primer lugar, a la amplificación mediante PCR de un fragmento interno de la ORF y a su clonación en un vector comercial pGEM-T, pGEM-T Easy o pMBL-T. Posteriormente, cada fragmento se transfería a los vectores pCSV3 o pRL424, que permiten realizar una selección positiva de plásmidos recombinantes (Elhai y Wolk, 1988b).

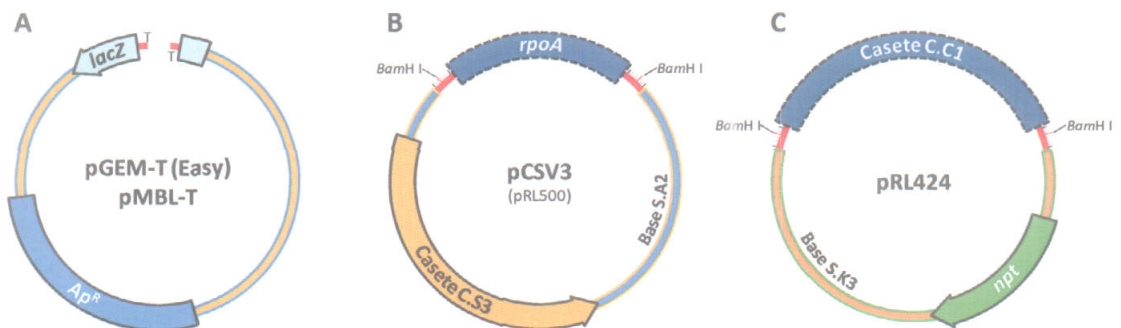


Figura 2.1. Vectores comerciales pGEM-T, pGEM-T Easy y pMBL-T de clonación de fragmentos de PCR y plásmidos pCSV3 y pRL424 utilizados para generar mutantes por recombinación simple. A, estructura común de los vectores comerciales pGEM-T, pGEM-T Easy y pMBL-T constituida por un gen de resistencia a Ap y el gen *lacZ* interrumpido por un sitio de clonación múltiple. B, plásmido pCSV3 constituido por la base S.A2, que contiene la casete de resistencia C.S3, y el sitio de clonación múltiple con el gen *rpoA* clonado. C, plásmido pRL424 formado por la base S.K3 con el gen *npt* y el sitio de clonación múltiple con la casete de resistencia C.C1 clonada en él. En B y C se señalan las dianas de restricción presentes en el sitio de clonación múltiple relevantes en este trabajo.

Los vectores comerciales utilizados para clonar productos de PCR presentan una estructura común que está constituida por un gen de resistencia al antibiótico Ap, que determina una β -lactamasa, y el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) interrumpido con un sitio de clonación múltiple que varía en cada uno de los vectores empleados (Figura 2.1A; véase el apartado siguiente). Por otra parte, el plásmido pCSV3

deriva del vector pRL500, en el que el gen de resistencia a Ap se ha sustituido por la casete de resistencia C.S3, y contiene un sitio de clonación múltiple simétrico en el que se encuentra clonado el gen *rpoA*, que no será de interés en este trabajo (Figura 2.1B; véase el apartado siguiente). Por último, el plásmido pRL424 contiene el gen *npt*, que determina la enzima neomicina fosfotransferasa, de resistencia a los antibióticos Km (empleada para *E. coli*) y Nm (utilizada para *Anabaena* sp. PCC 7120), y un sitio de clonación múltiple simétrico semejante al del vector pCSV3, en el que se encuentra clonada la casete de resistencia a antibióticos C.C1, de resistencia a Cm (Figura 2.1C; véase el apartado siguiente) (Elhai y Wolk, 1988b). Los vectores pCSV3 y pRL424 son no replicativos para *Anabaena* sp. y contienen una repetición invertida grande que converge en el sitio de clonación múltiple simétrico. Los plásmidos con estos palíndromos grandes no son viables en la mayoría de las estirpes de *E. coli*. Sin embargo, sí se pueden propagar si la secuencia palindrómica se interrumpe mediante la clonación en el sitio de clonación múltiple de un fragmento de DNA no palindrómico (Elhai y Wolk, 1988b).

2.9.2. Transferencia de DNA a *E. coli* mediante transformación.

Las células de *E. coli* no son transformables de forma natural, por lo que hay que someterlas a un tratamiento para que adquieran tal capacidad. Para ello se utilizó el procedimiento descrito por Hanahan (1983). Para llevar a cabo la transformación, se mezclaban 50-100 μl de suspensión de células transformables, previamente descongeladas en hielo, con 10-15 μl de la preparación de DNA transformante. La mezcla se incubaba en hielo durante 15 min, tras lo cual se sometía a un choque térmico mediante incubación a 42 °C durante 90 s. Después se mantenía 7 min a temperatura ambiente o 4 min en hielo, se añadía 1 ml de medio LB y se incubaba durante 1 h a 37 °C con agitación a 200 rpm. Por último, las células se sembraban en cajas de Petri que contenían medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados. Las frecuencias de transformación obtenidas con células de las estirpes de *E. coli* DH5 α y HB101 eran normalmente de 10^6 - 10^7 transformantes- μg^{-1} de DNA.

Para identificar mediante ensayos de complementación α transformantes que hubieran incorporado un plásmido con inserto derivado de los vectores pGEM-T, pGEM-T Easy o pMBL-T, el medio sólido se suplementaba con 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de X-gal (Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook y Russell, 2001). En este medio, las colonias portadoras de un plásmido con inserto eran de color blanco, mientras que las que habían recibido un plásmido sin inserto eran de color azul. En el caso de los plásmidos derivados de los vectores pCSV3 o pRL424 sólo crecían las colonias portadoras de un plásmido con inserto que interrumpe la zona palindrómica (Elhai y Wolk, 1988b).

2.9.3. Transferencia de DNA a *Anabaena* sp. mediante conjugación.

La transferencia de DNA a *Anabaena* sp. se realizaba, según se describe en Elhai y Wolk (1988a), mediante conjugación con una estirpe de *E. coli* que contenía el plásmido a transferir además del plásmido auxiliar pRL623 (Tabla 2.3). El plásmido pRL623 contiene genes que determinan metilasas de los sitios de restricción *Ava* I, *Ava* II y *Ava* III (Elhai *et al.*, 1997). Las metilaciones catalizadas por estas enzimas protegen al plásmido a transferir frente a las endonucleasas de restricción de la cianobacteria receptora. Los plásmidos eran movilizados mediante el plásmido conjugativo pRL443 (Tabla 2.3) (Elhai y Wolk, 1988a), aportado por una segunda estirpe de *E. coli*. La conjugación se realizaba tomando alícuotas de 0,25 ml de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* ED8654 (pRL443) y *E. coli* HB101 (pCSX, pRL623), donde pCSX es el plásmido a transferir, que se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Después de incubación a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 2,5 h, las células, en fase exponencial de crecimiento, se recogían mediante centrifugación, se lavaban dos veces con 10 ml de LB, y se mezclaban en un volumen de 100-200 μl del

mismo medio, incubándose a temperatura ambiente sin agitación durante 2 h. A continuación, se mezclaban con una suspensión celular de *Anabaena* sp. que contenía 10 µg de clorofila (en un volumen de 150-300 µl), y la mezcla se extendía sobre un filtro de nitrocelulosa (*Nucleopore*® REC-85 [Whatman]) dispuesto en una caja con medio de cultivo de cianobacterias permisivo suplementado con LB al 5% (v/v). Las cajas se incubaban a 30 °C con baja intensidad de luz durante 1-2 h y, posteriormente, en condiciones normales de cultivo durante 22-23 h. A continuación, los filtros se transferían a cajas con medio permisivo sin LB, que se incubaban 24 h en condiciones de cultivo, tras lo cual se pasaban a medio selectivo con antibióticos. Las colonias resistentes aparecían en este último medio tras 10-15 días de incubación.

Para segregar los cromosomas mutantes en las estirpes generadas se preparaban cultivos líquidos de varios de los exconjugantes obtenidos, los cuales se sometían a tratamiento en un baño sonicador para obtener filamentos cortos (3-5 células por filamento), sembrándose después alícuotas de diferentes diluciones de la suspensión celular en cajas con medio selectivo.

2.10. Microscopía confocal láser para la detección de la proteína testigo GFP.

En este trabajo se ha utilizado la proteína GFPmut2, una versión modificada de la proteína fluorescente verde que presenta el pico de excitación a 481 nm y el de emisión a 507 nm (Cormack *et al.*, 1996). La acumulación de la proteína testigo GFP se analizaba mediante microscopía láser confocal. Las muestras se visualizaban con un objetivo de inmersión en aceite HCX PLAN-APO 63X 1.4 NA, que estaba conectado a un microscopio confocal láser *Leica TCS SP2* (Leica, Wetzlar, Alemania). La proteína GFP se excitaba con una longitud de onda de 488 nm proporcionada por un láser de argón. La fluorescencia emitida por las estirpes derivadas de *Anabaena* sp. se analizaba utilizando ventanas de 500-570 nm, correspondiente a la fluorescencia de la GFP, y de 630-700 nm, correspondiente a la autofluorescencia de las cianobacterias. Todas las imágenes de un experimento se adquirían con los mismos parámetros, de forma que se podía establecer una comparación de la fluorescencia en las mismas.

2.11. Otros métodos analíticos.

2.11.1. Determinaciones espectrofotométricas.

Las medidas de absorbancia a longitud de onda fija se realizaban en un espectrofotómetro *U-1100* (Hitachi) o *Biomate 5* (Thermo Electron Corporation).

2.11.2. Determinación de la radiactividad en disoluciones conteniendo ³²P.

Para cuantificar la radiactividad incorporada en las sondas de DNA después del marcaje para los análisis de Southern (véase el apartado 2.8.9.4), se introducía en un vial de centelleo una alícuota de 1-2 µl de la mezcla de reacción a analizar, se añadían 5 ml de líquido de centelleo *Ready Protein*[™] (Beckman Coulter), se agitaba vigorosamente y se determinaba la tasa de desintegración radiactiva en un contador de centelleo *LS 6000 IC* (Beckman).

2.12. Análisis informático de secuencias de DNA y proteínas.

Para la búsqueda de pautas abiertas de lectura (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*), localización de sitios de restricción y traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos, así como para la determinación de perfiles de hidrofobicidad de proteínas, se utilizaba el programa *DNA Strider*, diseñado por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia). Para el diseño de los oligodesoxinucleótidos a utilizar como cebadores en reacciones de PCR se empleaba el programa *Amplify*, diseñado por Bill Engels (Genetics Department, University of Wisconsin, EE.UU.).

El acceso a la secuencia completa del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) se realizaba con la base de datos *CyanoBase* (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>; Kazusa DNA Research Institute, Japón). Asimismo, también se utilizaron las aplicaciones disponibles en esta base de datos (Kaneko *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 2001). La búsqueda en las bases de datos de secuencias similares a las analizadas en este trabajo se realizaba mediante las aplicaciones FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990). La predicción de la topología de proteínas de membrana se llevó a cabo utilizando los programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana *PSIPRED Server* (Department of Computer Science, University College London, Reino Unido) (McGuffin *et al.*, 2000), *SOSUI Engine 1.11* (Department of Applied Physics, Nagoya University, Japón) (Hirokawa *et al.*, 1998), *Localizome Server* (Lee *et al.*, 2006) y *TMHMM Server 2.0* (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Dinamarca) (Krogh *et al.*, 2001). Se utilizaba el programa CLUSTALW2 (European Bioinformatics Institute, EMBLEBI) (Chenna *et al.*, 2003) para el alineamiento de secuencias de DNA. La predicción informática de la posible localización subcelular de las proteínas se realizaba utilizando los programas *HMMTOP Server* (Tusnády y Simon, 1998, 2001), *TMHMM Server 2.0*, *PSORTb* (Gardy *et al.*, 2005), y *TopPred* (von Heijne, 1992; Claros y von Heijne, 1994), combinados con el análisis de posibles péptidos señal mediante los programas *SignalP* (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004) y *LipoP* (Juncker *et al.*, 2003). Para cada proteína analizada se propone la localización más consistente con los resultados obtenidos mediante los diferentes programas.

Para las representaciones gráficas de Michaelis-Menten de las cinéticas de transporte se utilizaba el programa *Origin® Working Model 6.0* (Microcal™ Software), empleando la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS.

3.1. Sistemas de transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Como se ha descrito en la *Introducción*, *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosas que en ausencia de nitrógeno combinado es capaz de desarrollar heterocistos (Wolk *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2004). Esta cianobacteria presenta una apreciable actividad de transporte de aminoácidos pertenecientes a diferentes grupos químicos (básicos, ácidos, neutros polares e hidrofóbicos) que es similar en filamentos incubados con nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado (Flores y Muro-Pastor, 1988; Herrero y Flores, 1990; Xu y McAuley, 1990; Montesinos *et al.*, 1995). Se ha interpretado que la actividad de transporte de aminoácidos en esta cianobacteria sea mediada por al menos cinco sistemas, que serían dos transportadores activos de aminoácidos neutros, denominados N-I y N-II, con especificidades solapadas pero no idénticas, dos transportadores de aminoácidos básicos, uno activo de alta afinidad y otro pasivo de baja afinidad, y un transportador de aminoácidos ácidos (Herrero y Flores, 1990; Montesinos *et al.*, 1995). Por otra parte, algunos experimentos de competencia han sugerido que los aminoácidos glutamina y glutamato podrían compartir transportador (Flores y Muro-Pastor, 1988).

En trabajos anteriores se planteó la posibilidad de que los sistemas de transporte de aminoácidos estuviesen implicados en el trasiego de moléculas que tiene lugar en el filamento diazotrófico entre los heterocistos y las células vegetativas, puesto que algunos mutantes espontáneos de transporte de aminoácidos de esta cianobacteria estaban afectados específicamente en el crecimiento diazotrófico. Este hecho implicaría que determinados aminoácidos sustrato de los sistemas afectados representarían vehículos de nitrógeno fijado transferidos desde los heterocistos hasta las células vegetativas (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Para analizar con detalle esta posibilidad y obtener más información sobre el papel fisiológico del transporte de aminoácidos en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, se propuso la caracterización de los genes de los transportadores de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120.

3.1.1. Sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I.

En dos tesis doctorales anteriores de este grupo de investigación se identificaron y clonaron los genes *natA*, *natC* y *natB* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Como se ha mencionado en la *Introducción*, estos genes corresponden a elementos del sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I, que es de tipo ABC, en el que *NatA* determinaría una proteína de unión de ATP, *NatC* correspondería a una proteína transmembrana y *NatB* sería una proteína periplásmica de unión de sustrato (Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Los genes *natA* y *natC* se encuentran agrupados en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, mientras que el gen *natB* no está agrupado con ningún otro gen relacionado funcionalmente (Figura 3.1). Por otra parte, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 el sistema de transporte homólogo al transportador N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120, que se denomina *Nat* y transporta aminoácidos neutros e His, incluye al menos dos proteínas más, denominadas *NatD* y *NatE*, que determinarían una segunda proteína de membrana y otra de unión de ATP, respectivamente (Montesinos *et al.*, 1997; Quintero *et al.*, 2001).

Los genes *natA*, *natC* y *natB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se habían inactivado por inserción de la casete C.S3, de resistencia a los antibióticos Sm y Sp, generándose los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6, respectivamente (Figura 3.1) (Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Esta casete de resistencia a antibióticos presenta terminadores de la transcripción en ambos extremos. Estos mutantes se habían caracterizado en cuanto a su capacidad de transporte de aminoácidos, observándose en los tres casos una actividad de transporte muy reducida para los aminoácidos Gly, Leu, Phe y Pro, mientras que la actividad de transporte de otros aminoácidos neutros como Ala, Gln y Ser se encontraba afectada sólo parcialmente,

a excepción del mutante CSS6, que presentaba una actividad de transporte de Gln similar a la de la estirpe silvestre. Asimismo, se había realizado un estudio detallado de la capacidad de crecimiento de estos mutantes utilizando diferentes fuentes de nitrógeno, habiéndose encontrado que los tres estaban afectados en el crecimiento diazotrófico, aunque en diferente grado, siendo mayor la deficiencia en el crecimiento de los mutantes CSX60 y CSX62 que del mutante CSS6 (Montesinos, 1997; Picossi, 2003).

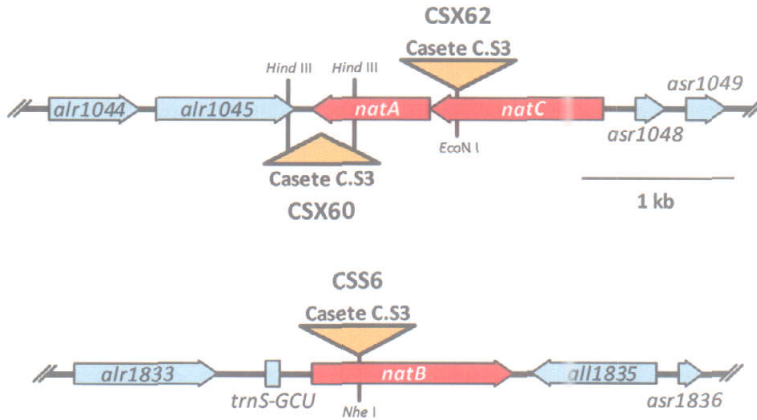


Figura 3.1. Disposición del agrupamiento génico *natCA* y del gen *natB* en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 y localización de las mutaciones introducidas en los genes *natA*, *natC* y *natB*. Se indican las localizaciones aproximadas de los sitios de inserción de la casete de resistencia C.S3. En la estirpe CSX60, la inserción conlleva la eliminación de una porción del gen.

Por otra parte, se había observado que mutantes espontáneos de transporte de aminoácidos neutros se caracterizaban por liberar aminoácidos al medio de cultivo, a diferencia de lo que ocurría en las cianobacterias silvestres, en las que no se liberaba prácticamente ningún aminoácido. De esta manera, en cultivos con nitrato como fuente de nitrógeno se encontraban aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Ile, Leu, Phe y Val, habiéndose propuesto que las permeasas inactivadas podrían emplearse en la estirpe silvestre para recuperar aminoácidos perdidos al atravesar las membranas celulares debido a su hidrofobicidad (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997; Montesinos, 1997). Este mismo fenotipo se observó en los mutantes CSX60 y CSS6 de *Anabaena* sp. PCC 7120, tanto en medios con nitrato como carentes de nitrógeno combinado, en los que además se encontró Pro, Tyr y Gly, aunque en menor cantidad (Picossi, 2003). Sin embargo, la liberación de aminoácidos al medio extracelular era dependiente de la fuente de nitrógeno utilizada, siendo más elevada en medios carentes de fuente de nitrógeno combinado que en medios con nitrato. En este sentido, la relación entre la concentración de los aminoácidos en medios de cultivo sin nitrógeno combinado y con nitrato era más elevada para los aminoácidos Leu, Pro y Tyr, y menor para Ile, Ala, Phe y Val, si bien la Ala era el aminoácido que se acumulaba en el medio a mayor concentración (Picossi, 2003). Así pues, los aminoácidos acumulados en el medio de las estirpes CSX60 y CSS6 eran precisamente aquéllos para los que el sistema de transporte N-I es la vía principal de entrada en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Montesinos *et al.*, 1995; Picossi, 2003). En cuanto a la expresión de los genes *natA*, *natC* y *natB*, se había determinado que tenía lugar en las células vegetativas de filamentos cultivados con amonio, nitrato o sin nitrógeno combinado, pero no en los heterocistos, y que los genes del agrupamiento génico *natCA* se cotranscribían (Picossi, 2003).

NatC se predice que sea una proteína transmembrana, por lo que su topología se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana (véase el apartado 2.12 de *Materiales y Métodos*). Según el consenso de las predicciones, esta proteína presentaría 8 segmentos transmembrana en hélice α , de los que 6 corresponderían a hélices α primarias y 2 a hélices α secundarias, disponiéndose los dos extremos de la proteína, amino y carboxilo, en el interior celular (Figura 3.2).

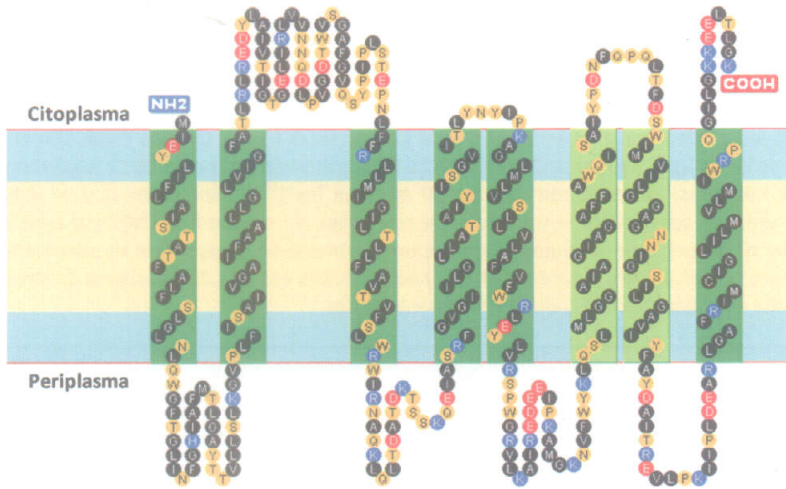


Figura 3.2. Predicción de la topología de la proteína NatC de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Las hélices α transmembrana se pueden clasificar como primarias o secundarias en función de si son capaces de penetrar dentro de la membrana por sí mismas o si necesitan ser estabilizadas por medio de interacciones con el resto de los segmentos transmembrana, respectivamente (Mitaku *et al.*, 1998). Así, mientras que las hélices α primarias podrían constituir el armazón de las proteínas de membrana, las secundarias podrían desempeñar un papel complementario en la estructura terciaria de este tipo de proteínas, estando también implicadas en su función en algunas ocasiones (Mitaku *et al.*, 1998).

3.1.1.1. Actividades de transporte de aminoácidos en las estirpes CSX60, CSX62 y CSS6.

Con el fin de acumular datos de la actividad de transporte de aminoácidos de las estirpes CSX60, CSX62 y CSS6 que pudieran utilizarse como control de los ensayos de transporte con las estirpes mutantes generadas en este trabajo, se decidió ensayar de nuevo los mutantes del sistema de transporte N-I que se habían generado en trabajos anteriores, utilizando como control la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 3.1). También se analizó la actividad de transporte para otros aminoácidos no estudiados anteriormente con estas estirpes mutantes, como el Glu en CSX60 y CSX62 y el Asp y la Phe en CSS6.

Como se esperaba, los tres mutantes analizados mostraban actividades muy bajas de transporte de Pro, Phe, Leu y Gly, y actividades bajas de Ala y Ser (Figura 3.3). Asimismo, los mutantes CSX60 y CSX62 también estaban afectados en el transporte de Gln e His, aunque la deficiencia en el transporte de Gln era más acusada en el mutante de la ATPasa (*natA*) que en el de la proteína de membrana (*natC*). Por el contrario, y a diferencia de los dos mutantes anteriores, el mutante de la proteína periplásmica de unión de sustrato (*natB*) presentaba actividades de transporte de His y Gln ligeramente más elevadas que la estirpe silvestre (Figura 3.3). Estos datos confirmaban los resultados obtenidos previamente (Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Respecto al transporte de los aminoácidos básicos Arg y Lys, éste era más elevado que el de la estirpe silvestre en todos los casos, si bien las diferencias eran más acusadas en el caso de la Lys (Figura 3.3). En relación a los aminoácidos ácidos Asp y Glu, que se ensayaban por primera vez en algunas de estas estirpes mutantes, el transporte se incrementaba en todas las estirpes mutantes analizadas, siendo especialmente significativa la actividad de transporte de Glu en el mutante de la proteína periplásmica de unión de sustrato NatB. El incremento de la actividad de transporte de

aminoácidos básicos y ácidos en las estirpes CSX60, CSX62 y CSS6 se analizará con más detalle en apartados posteriores de *Resultados* y en *Discusión*.

Tabla 3.1. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSX60, CSX62 y CSS6 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [14 C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μ M. Las actividades de transporte se presentan, en $\text{nmoles}\cdot(\text{mg Chl})^{-1}\cdot(10 \text{ min})^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis el gen inactivado. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos ($\text{nmoles}\cdot(\text{mg Chl})^{-1}\cdot(10 \text{ min})^{-1}$)			
	PCC 7120	CSS6 (<i>natB</i>)	CSX62 (<i>natC</i>)	CSX60 (<i>natA</i>)
Básicos				
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	135 \pm 8,81 (6)	131 \pm 18,1 (3)	133 \pm 8,48 (7)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	165 \pm 10,4 (6)	195 \pm 12,3 (5)	188 \pm 7,99 (7)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	102 \pm 3,97 (6)	78,3 \pm 1,15 (3)	69,8 \pm 1,47 (7)
Ácidos				
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	64,1 \pm 4,01 (7)	70,4 \pm 7,63 (4)	56,3 \pm 0,47 (25)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	25,6 \pm 1,28 (6)	18,1 \pm 1,65 (3)	16,2 \pm 1,29 (7)
Neutros polares				
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	122 \pm 4,65 (5)	85,4 \pm 5,68 (3)	76,0 \pm 0,53 (22)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	55,1 \pm 3,53 (5)	60,4 \pm 22,9 (2)	50,8 \pm 4,45 (6)
Hidrofóbicos				
Gly	200 \pm 3,30 (15)	18,1 \pm 2,01 (5)	8,25 \pm 0,28 (2)	17,9 \pm 1,62 (6)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	35,1 \pm 3,32 (3)	31,5 \pm 10,2 (2)	39,3 \pm 0,89 (6)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	4,70 \pm 0,33 (5)	6,44 \pm 2,65 (2)	4,74 \pm 0,39 (6)
Aromáticos				
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	4,30 \pm 0,36 (5)	4,88 \pm 0,28 (2)	4,18 \pm 0,23 (6)
Únicos				
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	0,66 \pm 0,12 (4)	1,35 \pm 0,14 (3)	1,57 \pm 0,17 (5)

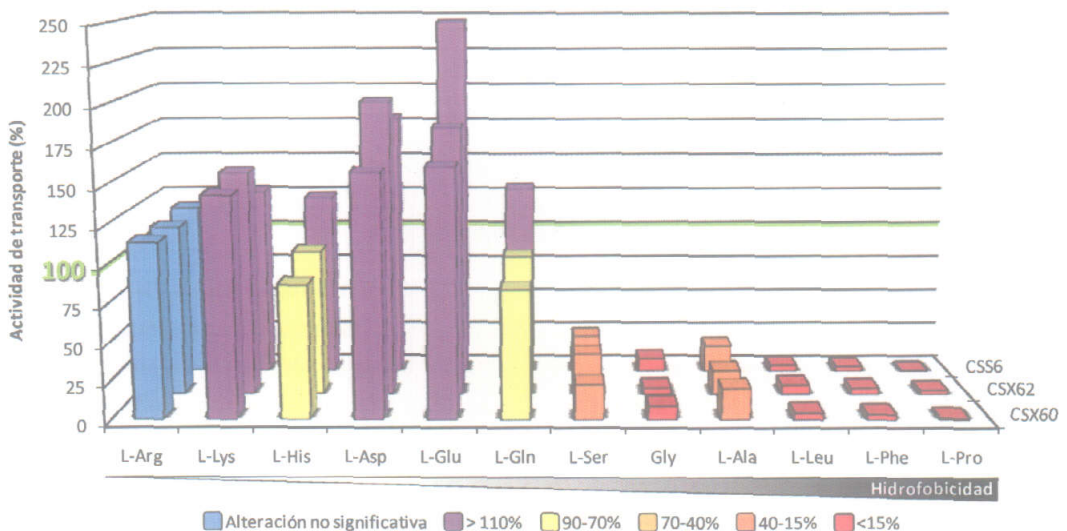


Figura 3.3. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6. Las actividades de transporte de las estirpes mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre. En amarillo se indican actividades del 90-70% respecto de las correspondientes en la estirpe silvestre, en naranja claro del 70-40%, en naranja oscuro del 40-15% y en rojo del 15-0%. En violeta se indican las actividades de transporte significativamente superiores a la de la estirpe silvestre, y en azul el resto de actividades que no difieren de forma significativa de las correspondientes de la estirpe silvestre. Se considera arbitrariamente como alteraciones no significativas las menores al 10%.

3.1.1.2. Identificación e inactivación de los genes *natD* y *natE*.

En el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) se encuentran dos ORFs, *all1284* y *all2912*, cuyos productos hipotéticos serían homólogos, respectivamente, a las proteínas NatD y NatE del sistema de transporte Nat de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Quintero *et al.*, 2001), por lo que se procedió a la inactivación de las mismas mediante la inserción *in vitro* de DNA exógeno.

La ORF *all1284* se dispone en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 sin formar parte de una unidad transcripcional con las ORFs que la flanquean (Figura 3.4). Esta ORF tiene un tamaño de 864 pb y determinaría un polipéptido de 288 aminoácidos con un 69% de identidades con la proteína NatD de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y un 31% con la proteína LivH del transportador de aminoácidos de cadena lateral ramificada LIV-I de *E. coli*.

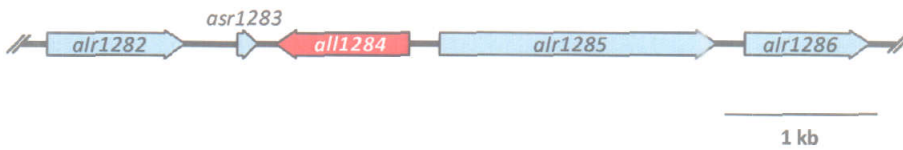


Figura 3.4. Disposición de la ORF *all1284* en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indica dicha ORF, así como las que la flanquean.

La proteína All1284 podría corresponder a una segunda subunidad de membrana del transportador N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120, como ocurre con NatD en el sistema de transporte Nat de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Así pues, la topología de esta proteína se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según el consenso resultante de las predicciones, la proteína All1284 presentaría 8 segmentos transmembrana en hélice α , de los que 4 corresponderían a hélices α primarias y los 4 restantes a hélices α secundarias, disponiéndose los dos extremos de la proteína, amino y carboxilo, en el interior celular (Figura 3.5).

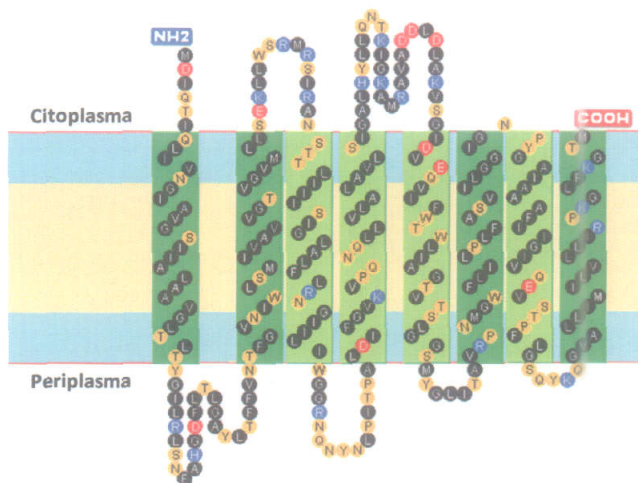


Figura 3.5. Predicción de la topología del producto de la ORF *all1284* de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácido hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Por su parte, la ORF *all2912* tiene un tamaño de 741 pb y determinaría una proteína de unión de ATP de 247 aminoácidos, con un 72% de identidades con la proteína NatE de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y un 45% con la proteína LivF del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada LIV-I de

E. coli. All2912 podría corresponder con una segunda subunidad de unión de ATP en el sistema de transporte N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120, al igual que ocurre con NatE en el sistema de transporte Nat de *Synechocystis* sp. PCC 6803. En esta región del cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 justo después de *all2912* se encuentra la ORF *all2911* (Figura 3.6), que tiene un tamaño de 1.155 pb y determinaría una proteína de 385 aminoácidos con un 29% de identidades con el canal de K⁺ dependiente de glutamato GluR0 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Chen *et al.*, 1999). Debido a que la construcción de la estirpe mutante en *all2912* se llevó a cabo mediante inserción, podría producirse un efecto polar sobre la expresión de *all2911*. Por ello, para poder estudiar el papel de *all2912*, también se generó un mutante por inserción en *all2911*.



Figura 3.6. Disposición de las ORFs *all2912* y *all2911* en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indican dichas ORFs, así como otras que las flanquean.

La topología de All2911 también se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. El consenso de estas predicciones indica que esta proteína podría estar constituida por 3 hélices α transmembrana, todas ellas primarias, disponiéndose en el citoplasma el extremo amino y en el espacio periplásmico el extremo carboxilo (Figura 3.7).

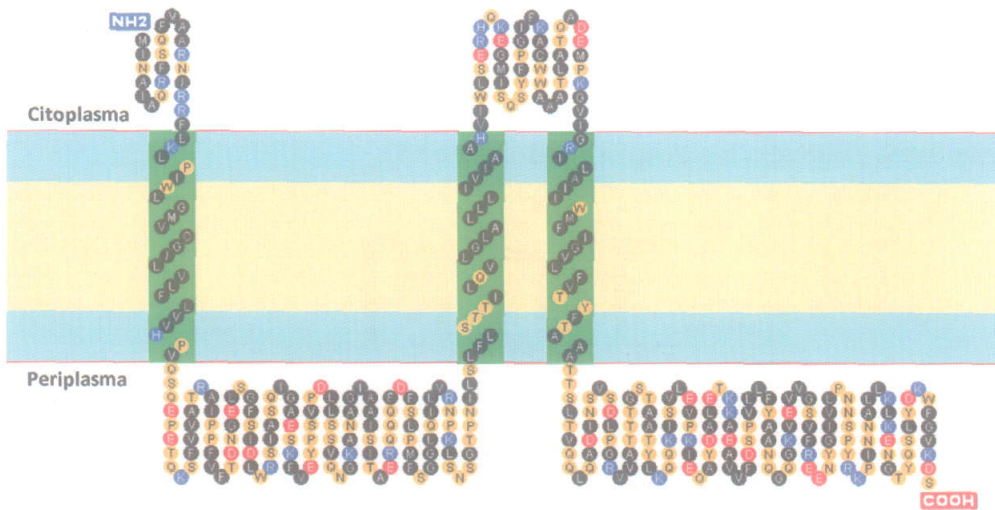


Figura 3.7. Predicción de la topología del producto de la ORF *all2911* de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas, mientras que los segmentos transmembrana de la proteína se indican en verde. En negro se muestran los residuos de aminoácido hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Para la inactivación de la ORF *all1284* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 506 pb, utilizando como molde DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y los oligonucleótidos *all1284*-7120-3 y *all1284*-7120-4, que portan en el extremo 5' una diana *Bam*H I (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos para las secuencias de los oligonucleótidos*). El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el vector pGEM-T Easy, generándose el plásmido pCSR36, el cual se digirió con la endonucleasa *Bam*H I, y el fragmento interno resultante de *all1284* con los extremos *Bam*H I se clonó en el vector pCSV3 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR44 (Figura 3.8). Dicho plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias

resistentes a Sm y Sp, que habrían incorporado la construcción transferida mediante recombinación simple.

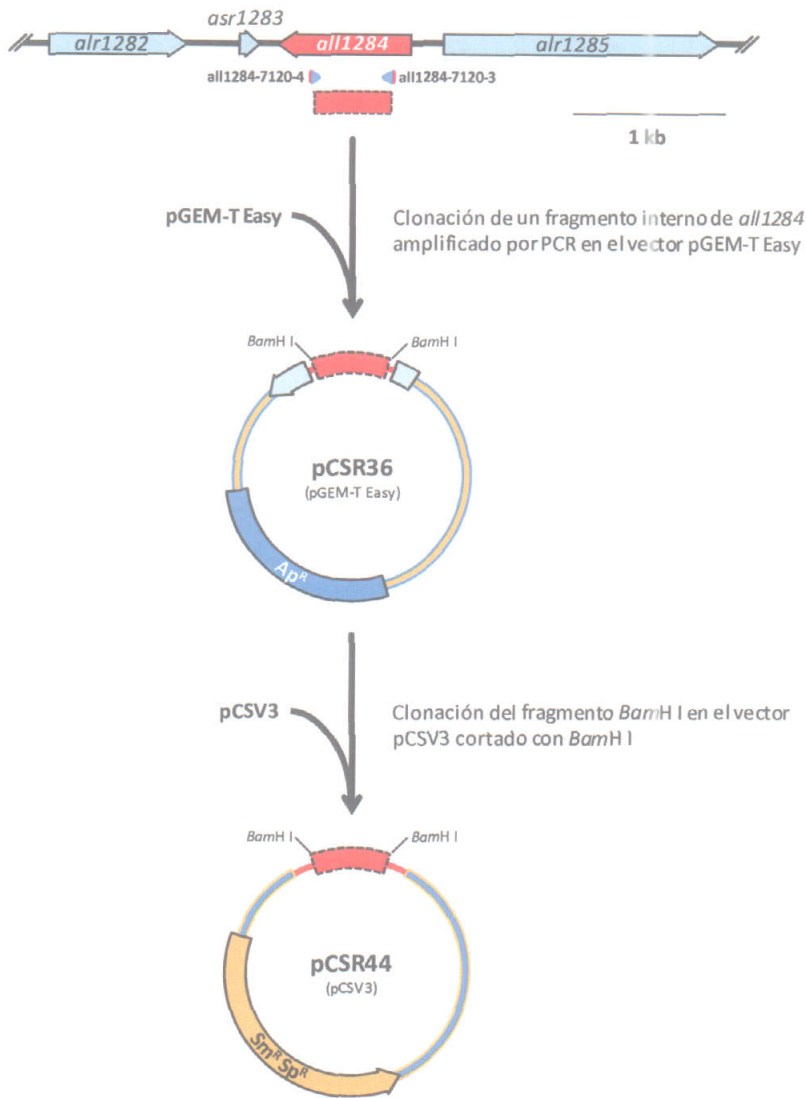


Figura 3.8. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR44 para la inactivación de *all1284*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH I*) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se analizó mediante PCR en varios clones seleccionados resultantes de la conjugación, utilizando para ello DNA genómico de las estirpes analizadas como molde y las parejas de oligonucleótidos *all1284-7120-5/all1284-7120-6* y *all2912-7120-3/all2912-7120-4* (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 781 pb en la estirpe silvestre y de 4.828 pb en los clones que tuvieran insertado en *all1284* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 691 pb (Figura 3.9). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia de la ORF *all2912*, localizada en otra región del genoma. Estos análisis permitieron comprobar que la inserción del vector se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *all1284* y que no había cromosomas silvestres remanentes en el clon seleccionado, que pasó a denominarse estirpe CSR11.

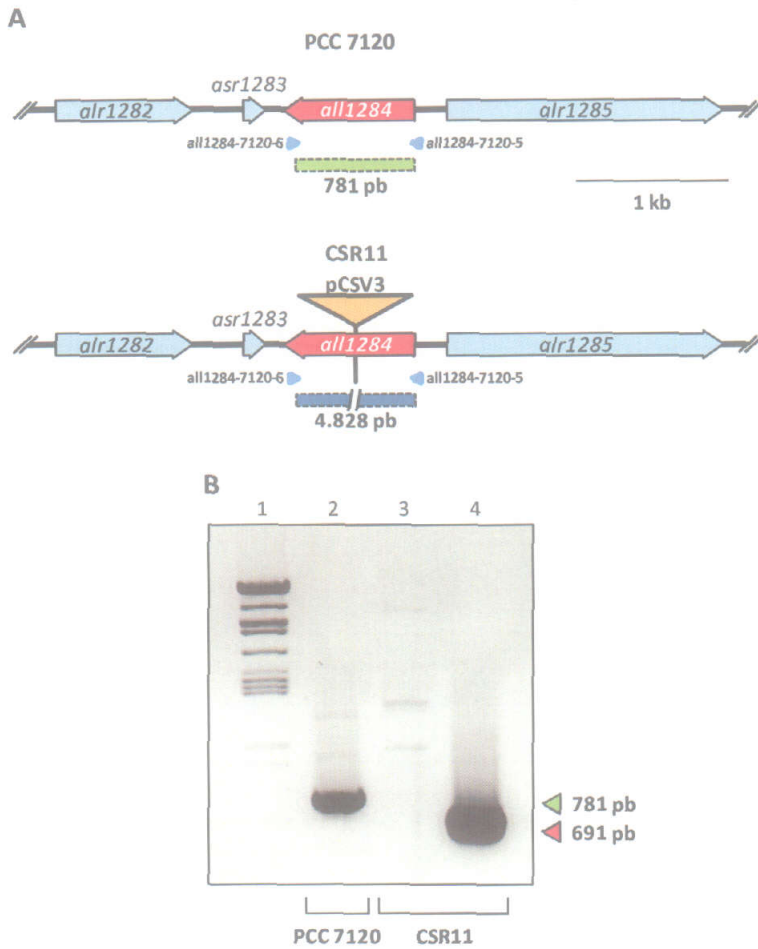


Figura 3.9. Estructura cromosómica de la estirpe CSR11 en la región *all1284*. A, región cromosómica de la estirpe silvestre y del mutante CSR11 que contiene la ORF *all1284*. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y CSR11. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de la estirpe CSR11. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *all1284-7120-5/all1284-7120-6* para las estirpes silvestre y mutante (triángulo verde), respectivamente, y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control *all2912-7120-3/all2912-7120-4* para la estirpe mutante (triángulo rojo).

Para la inactivación de la ORF *all2912* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 454 pb, utilizando como molde DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *all2912-7120-1* y *all2912-7120-2*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH* I (Figura 3.10; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T, generándose el plásmido pCSR3, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH* I, y el fragmento interno de *all2912* con los extremos *BamH* I se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR15. El vector pRL424 porta el gen *npt* de resistencia a Km (utilizada para *E. coli*) y Nm (utilizada para *Anabaena* sp.) y se caracteriza por carecer de terminadores transcripcionales (Elhai y Wolk, 1988b). Para la inactivación de la ORF *all2911* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 566 pb, utilizando para ello DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *all2911-7120-1* y *all2911-7120-2*, que contienen en su extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH* I (Figura 3.10; véase la Tabla 2.5). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T Easy, generándose el plásmido pCSR20, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH* I, y el fragmento interno de *all2911* con los extremos *BamH* I se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR24. Los plásmidos pCSR15 y pCSR24 se transfirieron a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación

y se seleccionaron colonias resistentes a Nm, que habrían incorporado la construcción transferida mediante recombinación simple.

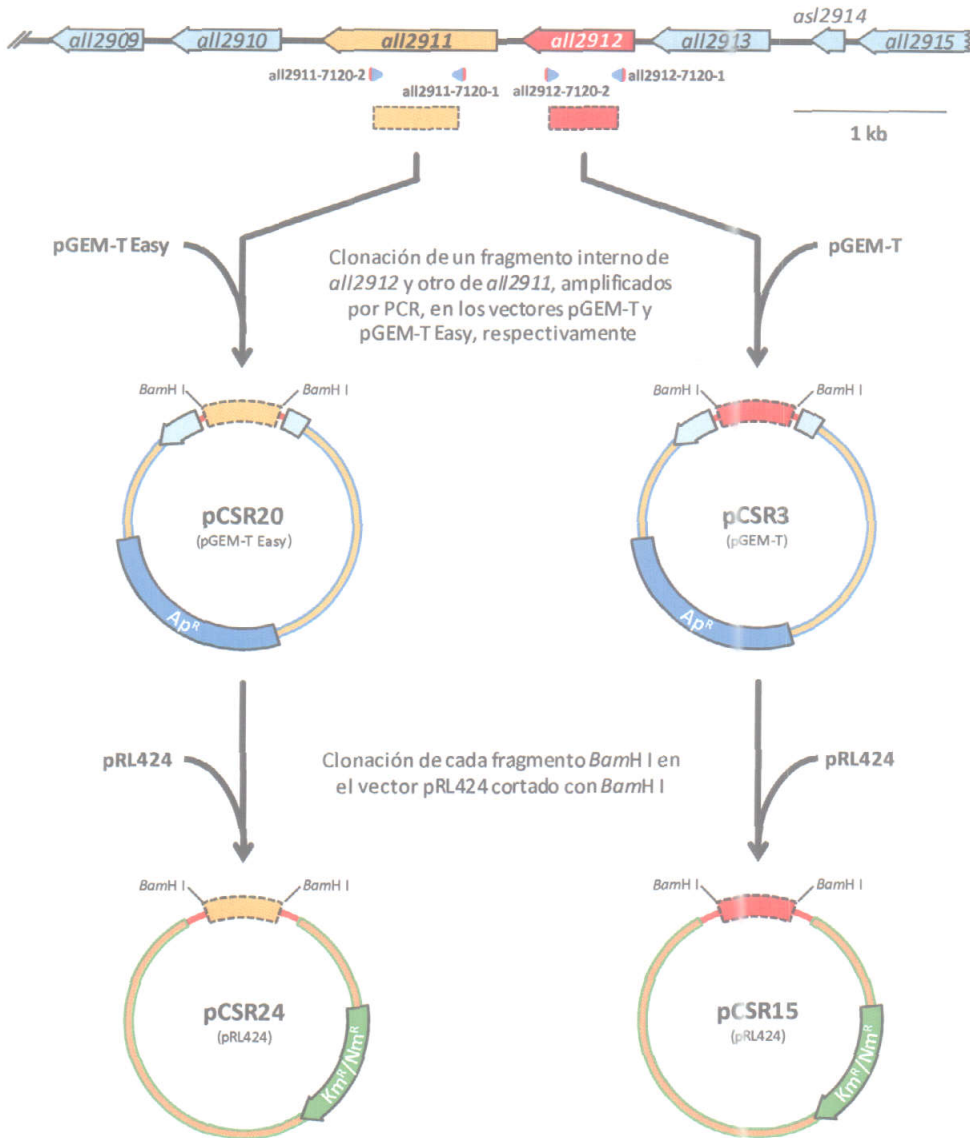


Figura 3.10. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR15 y pCSR24 para la inactivación de *all2912* y *all2911*, respectivamente. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH*I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

Tanto para la inactivación de *all2912* como para la de *all2911*, la estructura cromosómica en la región alterada se estudió mediante análisis de Southern en varios clones seleccionados resultantes de cada conjugación. En el caso de la primera ORF, el DNA se digería con la endonucleasa *Ase*I y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *all2912*, obtenido por restricción con *BamH*I del plásmido pCSR3, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.11A). En este análisis se esperaba una banda de 2,7 kb en la estirpe silvestre y de 5,8 kb en los clones que tuvieran insertado en *all2912* el plásmido transferido (Figura 3.11C). Por otra parte, en el caso de la segunda ORF el DNA se digería con la enzima de restricción *Dra*I y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *all2911*, obtenido por restricción con *BamH*I del plásmido pCSR20, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.11B). En este análisis se esperaba una banda de 2,2 kb en la estirpe silvestre y de 5,4 kb en los clones que tuvieran insertado en *all2911* el plásmido transferido (Figura 3.11D). Los análisis llevados a cabo

permitieron comprobar que la inserción de los plásmidos se había producido correctamente interrumpiendo la ORF correspondiente en los clones seleccionados, y que los cromosomas mutantes resultantes se encontraban completamente segregados para la inactivación de las ORFs *all2912* y *all2911*. Uno de los clones seleccionados de *Anabaena* sp. con la inserción en la ORF *all2912* pasó a denominarse estirpe CSR5, y otro de los que contenían la inserción en la ORF *all2911* se denominó estirpe CSR4.

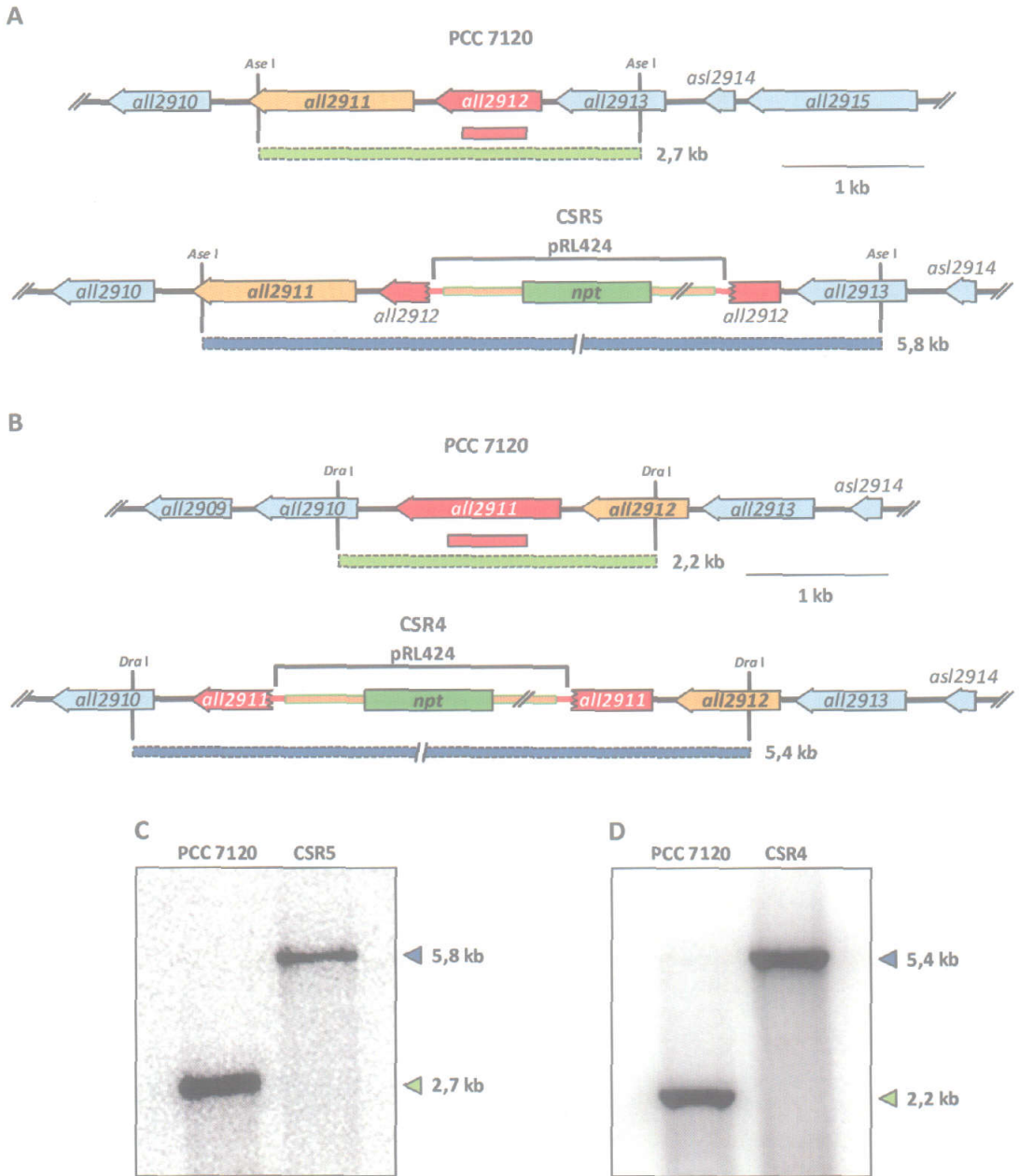


Figura 3.11. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes CSR5 y CSR4 en la región de las ORFs *all2912* y *all2911*, respectivamente. A, esquema de la región genómica de *all2912* en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe derivada CSR5. B, esquema de la región genómica de *all2911* en las estirpes silvestre y CSR4. En los paneles A y B se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de las estirpes mutantes, el fragmento correspondiente a la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja), las dianas de restricción Ase I y Dra I y el tamaño de las bandas esperadas de las estirpes silvestre (barras verdes) y mutantes (barras azules). C, análisis de Southern de la estructura genómica y grado de segregación del exconjugante CSR4. En los paneles C y D, se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulos verdes) y los mutantes (triángulos azules).

3.1.1.3. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSR11, CSR5 y CSR4.

Para determinar si las ORFs *all1284* y *all2912* correspondían a los genes *natD* y *natE* de *Anabaena* sp. PCC 7120, respectivamente, se llevaron a cabo una serie de ensayos de transporte de aminoácidos comparando los mutantes CSR11 y CSR5 con la estirpe silvestre (Tabla 3.2). También se incluyó la estirpe CSR4 en estos ensayos para analizar la posibilidad de que cualquier efecto observado de la inactivación de la ORF *all2912* en la estirpe CSR5 fuera debido a un efecto polar sobre la ORF *all2911*.

Al igual que ocurre con los mutantes CSX60, CSX62 y CSS6, los mutantes CSR11 (*all1284::pCSV3*) y CSR5 (*all2912::pRL424*) presentaban deficiencias en el transporte de Pro, Phe, Leu y Gly y, en menor medida, Ala, Ser y Gln, aunque el transporte estaba más afectado para Ala y Ser que para Gln (Figura 3.12). Sin embargo, la estirpe CSR4 (*all2911::pRL424*) presentaba actividades de transporte de los aminoácidos ensayados similares a las de la estirpe silvestre. Por otra parte, el transporte de los aminoácidos básicos Arg y Lys presentaba valores más elevados que en la estirpe silvestre, a excepción de la Arg en la estirpe CSR5, al igual que ocurría en los mutantes *natA*, *natC* y *natB*. Estos resultados permitieron identificar a las ORFs *all1284* y *all2912* como los genes *natD* y *natE*, respectivamente, que determinan dos elementos del sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120. Por otra parte, al igual que en los mutantes *natA*, *natC* y *natB*, la actividad de transporte de los aminoácidos ácidos Asp y Glu se incrementaba en el mutante *natD* (Figura 3.12), siendo este incremento similar al observado en las estirpes CSX60 y CSX62, si bien el aumento de la actividad de transporte de Glu no era tan acusado como en el mutante CSS6. Sin embargo, en el mutante CSR5 (*natE*) sólo se observaba un pequeño aumento de la actividad de transporte de Asp. Estos resultados se tratarán con más detalle en apartados posteriores de *Resultados* y *Discusión*.

Tabla 3.2. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR11, CSR5 y CSR4. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSR11, CSR5 y CSR4 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 10 μM. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis la ORF inactivada. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·(mg Chl) ⁻¹ ·(10 min) ⁻¹)			
	PCC 7120	CSR11 (<i>all1284</i>)	CSR5 (<i>all2912</i>)	CSR4 (<i>all2911</i>)
Básicos				
L-Arg	125 ± 1,59 (25)	141 ± 17,0 (4)	126 ± 10,8 (6)	130 ± 8,78 (3)
L-Lys	138 ± 1,55 (16)	198 ± 8,65 (4)	173 ± 13,7 (6)	136 ± 16,9 (2)
L-His	88,0 ± 1,10 (16)	78,6 ± 2,68 (3)	70,0 ± 3,36 (6)	79,4 ± 0,45 (2)
Ácidos				
L-Asp	37,3 ± 0,39 (27)	70,1 ± 3,07 (4)	40,4 ± 1,37 (6)	37,2 ± 2,94 (4)
L-Glu	10,5 ± 0,12 (25)	18,2 ± 0,86 (4)	10,6 ± 0,23 (5)	9,51 ± 0,07 (2)
Neutros polares				
L-Gln	99,4 ± 0,90 (30)	83,5 ± 4,40 (4)	74,1 ± 2,68 (6)	91,4 ± 2,55 (3)
L-Ser	218 ± 2,50 (10)	67,0 ± 21,4 (2)	68,3 ± 5,13 (5)	197 ± 24,8 (2)
Hidrofóbicos				
Gly	200 ± 3,30 (15)	15,1 ± 3,66 (2)	10,5 ± 1,28 (5)	208 ± 11,8 (2)
L-Ala	192 ± 1,09 (20)	43,4 ± 5,63 (2)	33,3 ± 1,71 (5)	200 ± 0,97 (3)
L-Leu	103 ± 0,99 (17)	7,31 ± 1,18 (3)	6,00 ± 5,80 (5)	96,4 ± 4,94 (2)
Aromáticos				
L-Phe	118 ± 1,87 (16)	4,85 ± 0,27 (2)	4,22 ± 0,09 (5)	117 ± 15,9 (3)
Únicos				
L-Pro	135 ± 1,99 (16)	1,95 ± 0,68 (3)	1,34 ± 0,09 (5)	129 ± 2,95 (3)

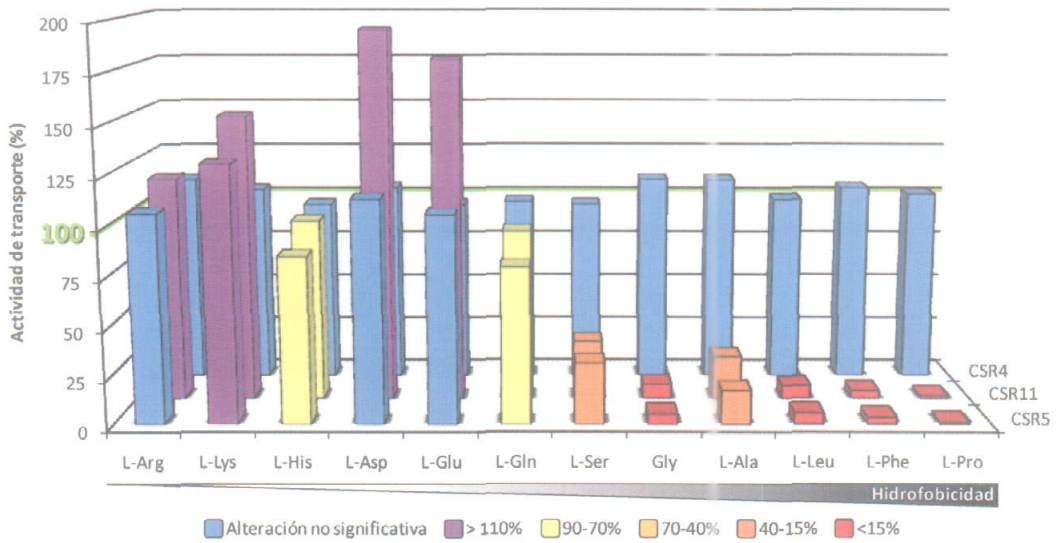


Figura 3.12. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR11, CSR5 y CSR4. Las actividades de transporte de las estirpes mutantes se presentan como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

Así pues, el sistema de transporte N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120 estaría constituido por, al menos, cinco subunidades diferentes, dos de las cuales serían subunidades de unión de ATP, determinadas por los genes *natA* y *natE*, otras dos serían subunidades transmembrana, determinadas por los genes *natC* y *natD*, y la subunidad restante sería una proteína periplásmica de unión de sustrato, determinada por el gen *natB*. Sin embargo, podrían existir proteínas periplásmicas de unión de sustrato alternativas, como ocurre con algunos otros sistemas de transporte de tipo ABC.

3.1.2. Sistema de transporte de aminoácidos básicos Bgt.

Siguiendo con la búsqueda de sistemas de transporte de aminoácidos que pudieran tener un papel en el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120, en este trabajo también se estudió el transporte de aminoácidos básicos. Como se comentó en el apartado 1.4.2 de *Introducción*, esta cianobacteria presenta dos actividades para el transporte de aminoácidos básicos, siendo una de alta afinidad y otra de baja afinidad (Herrero y Flores, 1990). No obstante, este estudio se ha centrado sólo en la permeasa de alta afinidad de aminoácidos básicos Bgt.

Como se ha mencionado en la *Introducción*, en *Synechocystis* sp. PCC 6803 el sistema Bgt transporta aminoácidos básicos y Gln y es de tipo ABC, con la peculiaridad de que el componente de membrana del sistema y la proteína periplásmica de unión de sustrato están fusionados. Esta proteína de fusión está determinada por el gen *bgtB*, mientras que la proteína de unión de ATP la determina el gen *bgtA* (Quintero *et al.*, 2001). En una tesis doctoral anterior de este grupo de investigación se identificó el gen *bgtB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Picossi, 2003), el cual no parece estar agrupado con ningún otro gen relacionado funcionalmente (Figura 3.13). Sin embargo, el gen *bgtA* no se había identificado en esta cianobacteria.

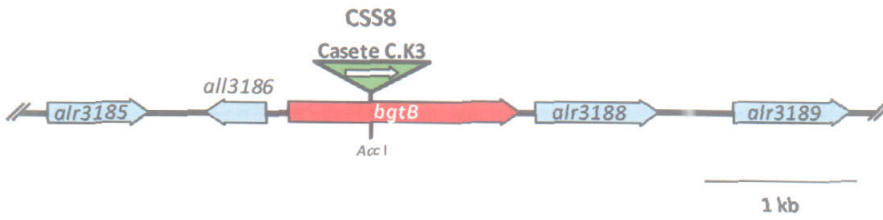


Figura 3.13. Disposición del gen *bgtB* en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la casete génica introducida en el mismo. Se indica la localización del gen *bgtB* con respecto a las ORFs flanqueantes. También se indica el sitio de inserción de la casete de resistencia C.K3 y su orientación en la estirpe mutante CSS8 (Picossi, 2003).

Dado que el gen *bgtB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 determinaría una proteína con un dominio transmembrana, además del dominio periplásmico de unión de sustrato, la topología de esta proteína se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según estas predicciones, la proteína BgtB presentaría 6 segmentos transmembrana en hélice α , de los que 3 corresponderían a hélices α primarias y los otros 3 a hélices α secundarias, y los extremos de la proteína, amino y carboxilo, se dispondrían en el interior celular (Figura 3.14). Sin embargo, las predicciones de la topología de esta proteína indican que la primera hélice α correspondería a un péptido señal que se cortaría en el periplasma a su salida de la membrana plasmática entre los residuos Ser y Gln, quedando de esta forma el dominio de unión de sustrato en el espacio periplásmico, aunque anclado a la membrana plasmática por medio de la segunda hélice α (Figura 3.14).

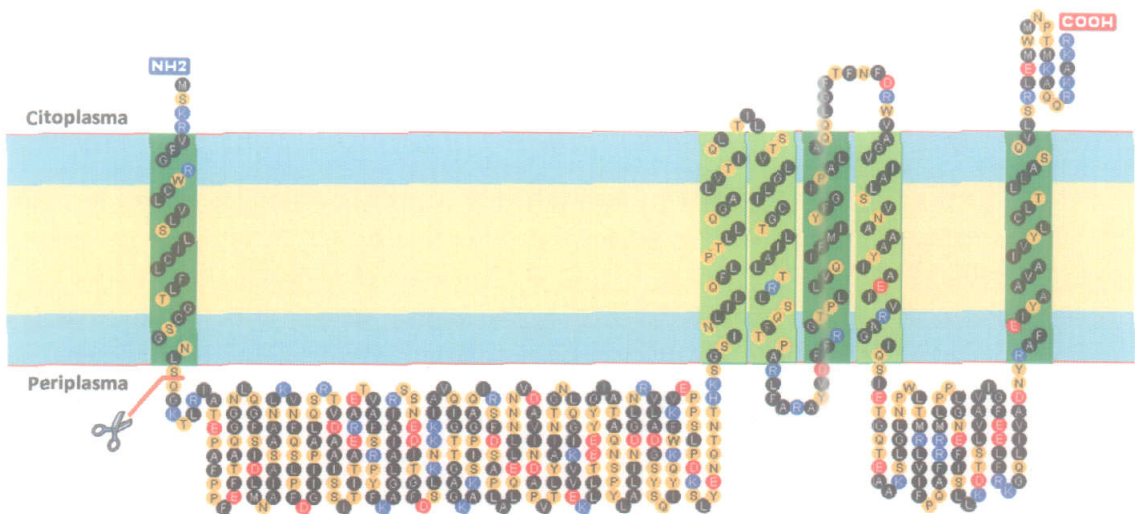


Figura 3.14. Predicción de la topología de la proteína BgtB de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácido hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos. Se indica con unas tijeras la posición del posible sitio de corte del péptido señal de BgtB.

El gen *bgtB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se había inactivado por inserción de la casete de resistencia C.K3, generándose los mutantes CSS8 y CSS9, en los que la casete se había insertado en orientación directa e inversa con respecto al gen *bgtB*, respectivamente (véase la estirpe CSS8 en la Figura 3.13). (Picossi, 2003). Esta casete de resistencia a antibióticos no posee terminadores de la transcripción, por lo que permite un nivel apreciable de transcripción por detrás de la misma (Frías *et al.*, 2000). Estos mutantes se habían caracterizado en cuanto a su capacidad de transporte de aminoácidos, observándose en ambos casos una actividad de transporte muy reducida para los aminoácidos básicos Arg y Lys y, en menor medida, His, que es parcialmente básica al pH de los ensayos (Picossi, 2003). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en los mutantes *bgtB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Quintero *et al.*, 2001),

estos mutantes no estaban afectados en el transporte de Gln (Picossi, 2003). Asimismo, también se había realizado un estudio de la capacidad de crecimiento de los mutantes CSS8 y CSS9 con diferentes fuentes de nitrógeno, habiéndose determinado que no estaban afectados ni en el crecimiento diazotrófico ni en el crecimiento a expensas de nitrato (Picossi, 2003).

3.1.2.1. Identificación e inactivación del gen *bgtA*.

En el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001), la ORF cuyo producto hipotético tiene un mayor grado de similitud con la proteína BgtA del sistema de transporte Bgt de aminoácidos básicos y Gln de *Synechocystis* sp. PCC 6803 es *alr4167*. La ORF *alr4167* tiene un tamaño de 744 pb y determinaría un polipéptido de 248 aminoácidos con un 51% de identidades con la proteína BgtA de *Synechocystis* sp. PCC 6803, un 67% con la proteína AapP de la permeasa general de aminoácidos de *Rhizobium leguminosarum* (Walshaw y Poole, 1996) y un 64% con la proteína BztD del sistema de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn de *Rhodobacter capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996). La ORF *alr4167* se encuentra formando parte de un agrupamiento génico junto con las ORFs *alr4164*, *alr4165* y *alr4166* (Figura 3.15). Este agrupamiento podría determinar los elementos de otro posible transportador de tipo ABC, y su estudio se describirá en el apartado 3.1.3.



Figura 3.15. Disposición de la ORF *alr4167* en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indica la ORF *alr4167* en rojo y las ORFs *alr4164* (en verde), que podría determinar una proteína periplásmica de unión de sustrato, y *alr4165* y *alr4166* (en naranja), que podrían determinar proteínas transmembrana.

Para la inactivación de la ORF *alr4167* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 505 pb, utilizando como molde DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y como cebadores los oligonucleótidos *alr4167-7120-3* y *alr4167-7120-4*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH* I (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el vector pGEM-T Easy, generándose el plásmido pCSR35. Este plásmido se digirió con la endonucleasa *BamH* I, y el fragmento interno de *alr4167* con los extremos *BamH* I se clonó en el vector pCSV3 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR43 (Figura 3.16). Dicho plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Sm y Sp que habrían incorporado la construcción transferida.

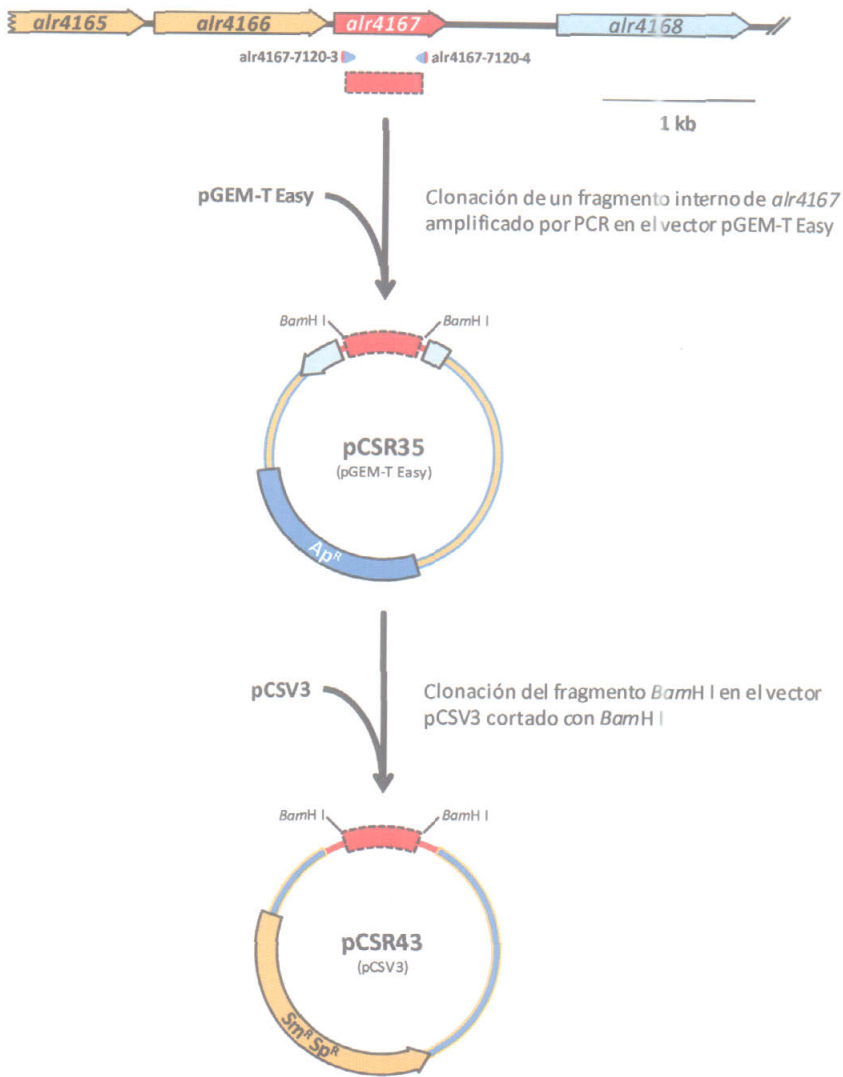


Figura 3.16. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR43 para la inactivación de *alr4167*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *Bam*H I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se analizó mediante PCR en varios clones seleccionados resultantes de la conjugación, utilizando para ello DNA genómico de las estirpes analizadas como molde y las parejas de oligonucleótidos *alr4167-7120-5/alr4167-7120-6* y *alr4166-7120-3/alr4166-7120-4* (véase la Tabla 2.5 del apartado *Materiales y Métodos* para las secuencias). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 613 pb en la estirpe silvestre y de 4.660 pb en los clones que tuvieran insertado en *alr4167* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 763 pb (Figura 3.17). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia de la ORF *alr4166*, localizada delante de la ORF *alr4167*. Estos análisis permitieron comprobar que la inserción del vector se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *alr4167* y que no había cromosomas silvestres remanentes en el clon seleccionado, que pasó a denominarse estirpe CSR10.

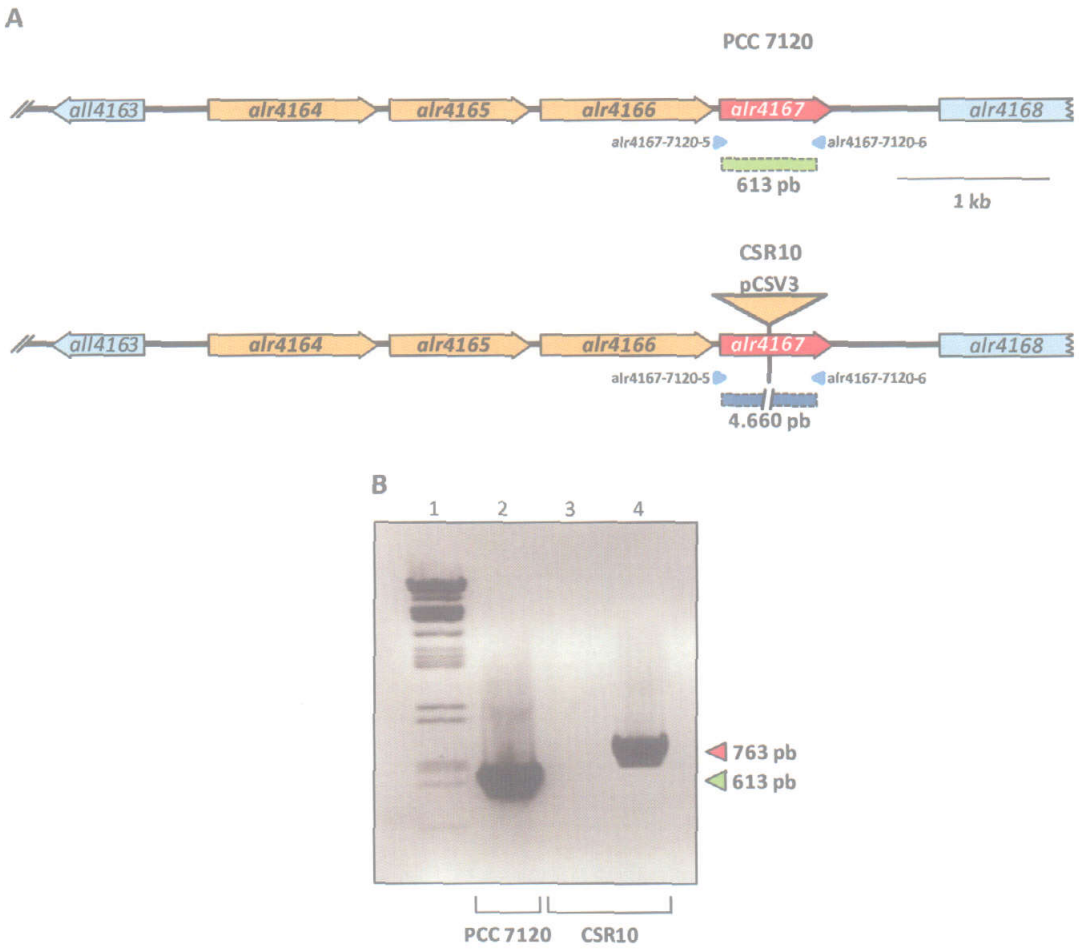


Figura 3.17. Estructura cromosómica de la estirpe CSR10 en la región *alr4167*. A, región cromosómica de la estirpe silvestre y del mutante CSR10 que contiene la ORF *alr4167*. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y CSR10. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de la estirpe CSR10. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos *alr4167-7120-5/alr4167-7120-6* para las estirpes silvestre y mutante (triángulo verde), respectivamente, y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control *alr4166-7120-3/alr4166-7120-4* para la estirpe mutante (triángulo rojo).

3.1.2.2. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSS8 y CSR10.

Con objeto de determinar si la ORF *alr4167* correspondía al gen *bgtA*, se realizaron una serie de ensayos de transporte de aminoácidos comparando el mutante CSR10 (*alr4167::pCSV3*) con la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y el mutante CSS8 (*bgtB::C.K3*) (Tabla 3.3). En la estirpe CSS8, el estudio de las actividades de transporte de una serie de aminoácidos representativos corroboró los resultados previos (Picossi, 2003), mostrando un transporte deficiente de los aminoácidos básicos Arg y Lys y, en menor medida, His, que se encuentra parcialmente en su forma básica al pH de los ensayos de transporte (Figura 3.18). Sin embargo, también se observaba una cierta incapacidad para el transporte del aminoácido ácido Asp, que no se había ensayado en esta estirpe en trabajos anteriores y, en menor medida, de Gln y Ala. Las actividades de transporte de Gln, Asp y Ala observadas en esta estirpe se analizarán con mayor profundidad en los apartados 3.1.3.2 y 3.2.3. Asimismo, cabe destacar que este mutante presentaba un aumento de la actividad de transporte de Leu, Phe y Pro, aminoácidos que son transportados exclusivamente por el sistema de transporte N-I (véase el apartado 3.1.1).

Tabla 3.3. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS8 y CSR10. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSS8 y CSR10 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [14 C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μ M. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles \cdot (mg Chl) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis la ORF o el nombre del gen inactivado. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles \cdot [mg Chl] $^{-1}\cdot$ [10 min] $^{-1}$)		
	PCC 7120	CSS8 (<i>bgtB</i>)	CSR10 (<i>alr4167</i>)
Básicos			
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	7,07 \pm 0,77 (6)	6,77 \pm 0,42 (8)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	7,84 \pm 0,31 (5)	6,59 \pm 0,40 (8)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	71,4 \pm 1,90 (7)	64,9 \pm 3,12 (7)
Ácidos			
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	29,0 \pm 0,69 (5)	1,73 \pm 0,05 (9)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	9,97 \pm 1,15 (5)	7,11 \pm 0,17 (8)
Neutros polares			
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	83,4 \pm 5,85 (5)	86,6 \pm 1,45 (8)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	231 \pm 6,26 (5)	220 \pm 12,2 (6)
Hidrofóbicos			
Gly	200 \pm 3,30 (15)	207 \pm 3,96 (7)	213 \pm 8,90 (6)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	167 \pm 3,64 (6)	161 \pm 2,21 (6)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	167 \pm 6,41 (7)	124 \pm 5,24 (7)
Aromáticos			
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	150 \pm 4,95 (7)	130 \pm 7,80 (6)
Únicos			
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	218 \pm 10,9 (5)	131 \pm 9,09 (4)

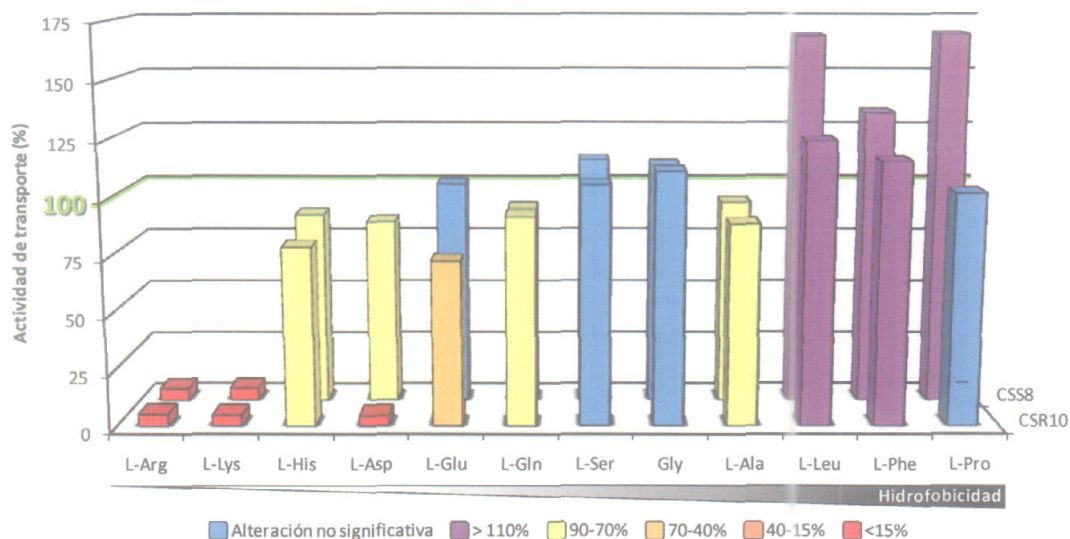


Figura 3.18. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS8 y CSR10. Las actividades de transporte de los mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

Por otra parte, los ensayos de transporte de aminoácidos en la estirpe CSR10 también mostraban una deficiencia en el transporte de aminoácidos básicos y, en menor grado, His, permitiendo identificar a la ORF *alr4167* como el gen *bgtA* del sistema de transporte de aminoácidos básicos Bgt de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Figura 3.18). Esta estirpe también presentaba una clara deficiencia en el transporte de Asp y estaba afectada en el transporte de Glu y, en menor medida, de algunos aminoácidos neutros como

Gln y Ala. Estos resultados sugerían que Alr4167 es una subunidad ATPasa que no sólo forma parte del sistema Bgt, sino también de otro transportador que pudiera mediar la Importación de, al menos, aminoácidos ácidos. Estos datos se analizarán con más detalle en el apartado 3.1.3. Por otra parte, al igual que se observó en la estirpe mutante CSS8, en el mutante CSR10 también se observaba un aumento de la actividad de transporte de aminoácidos hidrofóbicos, aunque en este caso no afectaba al transporte de Pro (Figura 3.18).

3.1.3. Sistema de transporte de aminoácidos ácidos y neutros N-II.

Como se ha comentado en el apartado 1.4.1, en *Anabaena* sp. PCC 7120 se han encontrado dos sistemas de transporte para aminoácidos neutros, denominados N-I y N-II (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997). El primero de ellos se ha descrito en detalle en el apartado 3.1.1, mientras que el segundo sólo ha sido descrito fisiológicamente en trabajos anteriores, desconociéndose los elementos moleculares que lo constituyen (Montesinos *et al.*, 1995).

3.1.3.1. Inactivación de las ORFs *alr4164* y *alr4166*.

Como se ha descrito en el apartado 3.1.2.1, mediante la búsqueda en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 de homólogos de la proteína BgtA de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se encontró la ORF *alr4167*, que resultó ser el gen *bgtA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. El gen *bgtA* se dispone formando un agrupamiento con las ORFs *alr4164*, *alr4165* y *alr4166*, que determinarían, respectivamente, una proteína periplásmica de unión de sustrato y dos proteínas transmembrana (Figura 3.15).

La ORF *alr4164* tiene un tamaño de 1.107 pb y determinaría un polipéptido de 369 aminoácidos con un 50% de identidades con la proteína AapJ de la permeasa general de aminoácidos de *Rhizobium leguminosarum* (Walshaw y Poole, 1996) y un 48% con la proteína BztA del sistema de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn de *Rhodobacter capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996). Dado que AapJ y BztA son proteínas periplásmicas de unión de sustrato de sus respectivos sistemas, Alr4164 podría corresponder a una proteína periplásmica de unión de sustrato.

Por otra parte, las ORFs *alr4165* y *alr4166* determinarían dos posibles proteínas transmembrana. La primera tiene un tamaño de 924 pb y determinaría una proteína de 308 aminoácidos con un 33% de identidades con la región transmembrana de la proteína BgtB de *Anabaena* sp. PCC 7120 (véase el apartado 3.1.2) (Picossi, 2003), un 50% de identidades con la proteína AapQ de la permeasa general de aminoácidos de *Rhizobium leguminosarum* (Walshaw y Poole, 1996) y un 48% con la proteína BztB del sistema de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn de *Rhodobacter capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996). La segunda tiene un tamaño de 1.143 pb y determinaría un polipéptido de 381 aminoácidos con un 34% y 32% de identidades con las proteínas BgtB y Alr4165, respectivamente, de *Anabaena* sp. PCC 7120, un 35% con la proteína AapM de la permeasa general de aminoácidos de *Rhizobium leguminosarum* (Walshaw y Poole, 1996) y un 37% con la proteína BztC del sistema de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn de *Rhodobacter capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996). Dado que ambas ORFs parecían determinar proteínas transmembrana, la topología de las mismas se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según el consenso obtenido a partir de estas predicciones, Alr4165 presentaría 8 segmentos en hélice α , de los que 4 corresponderían a hélices α primarias y los otros 4 a hélices α secundarias, y los extremos de la proteína, amino y carboxilo, se dispondrían en el interior celular (Figura 3.19A), mientras que la proteína Alr4166 presentaría 10 segmentos en hélice α , de los que 9 corresponderían a hélices α primarias y el restante a una hélice α secundaria, disponiéndose sus extremos amino y carboxilo en el interior celular (Figura 3.19B).

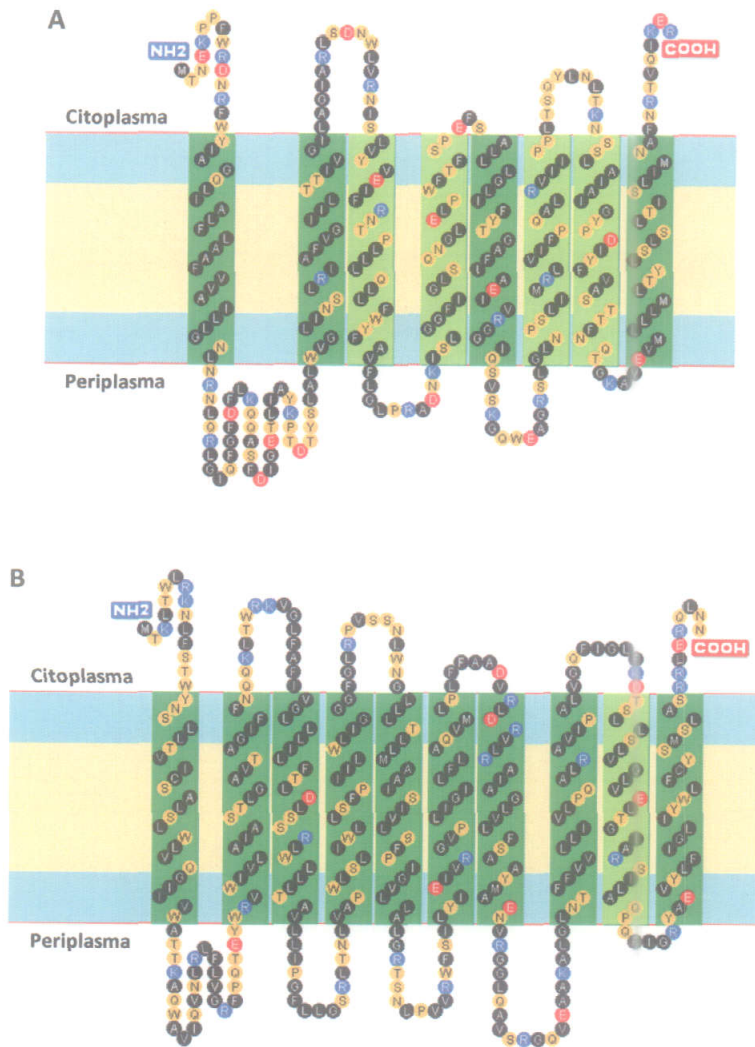


Figura 3.19. Predicción de la topología de los productos de las ORFs *alr4165* y *alr4166* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Predicción de la topología de las proteínas Alr4165 (A) y Alr4166 (B). En las membranas plasmáticas se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácido hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Dado que el agrupamiento génico *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA* podría determinar los elementos de otro posible transportador de aminoácidos, se decidió proceder a la inactivación de las ORFs *alr4164* y *alr4166*. Para la inactivación de la ORF *alr4166* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 575 pb, utilizando como molde DNA genómico de la estirpe silvestre y como cebadores los oligonucleótidos *alr4166-7120-1* y *alr4166-7120-2*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH* I (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T, generándose el plásmido pCSR6, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH* I, y el fragmento interno de *alr4166* con los extremos *BamH* I se clonó en el vector pCSV3 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR12 (Figura 3.20). Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Sm y Sp, en las que las construcciones transferidas se habrían incorporado en el genoma. Debido a que la construcción de esta estirpe mutante se realizó mediante la inserción del vector pCSV3, que al contener la casete C.S3 presenta terminadores de la transcripción, la inserción en *alr4166* podría tener un efecto polar sobre la expresión del gen *bgtA*, por lo que también se generó un mutante de la ORF *alr4166* con otro plásmido derivado del vector pRL424, el cual carece de terminadores de la transcripción, como se comentó en el apartado 3.1.1.2.

Para ello, el fragmento interno de la ORF *alr4166* con los extremos *BamH* I, obtenido a partir del plásmido pCSR6 por restricción con dicha endonucleasa, se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma enzima de restricción, generándose el plásmido pCSR16 (Figura 3.20). Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Nm.

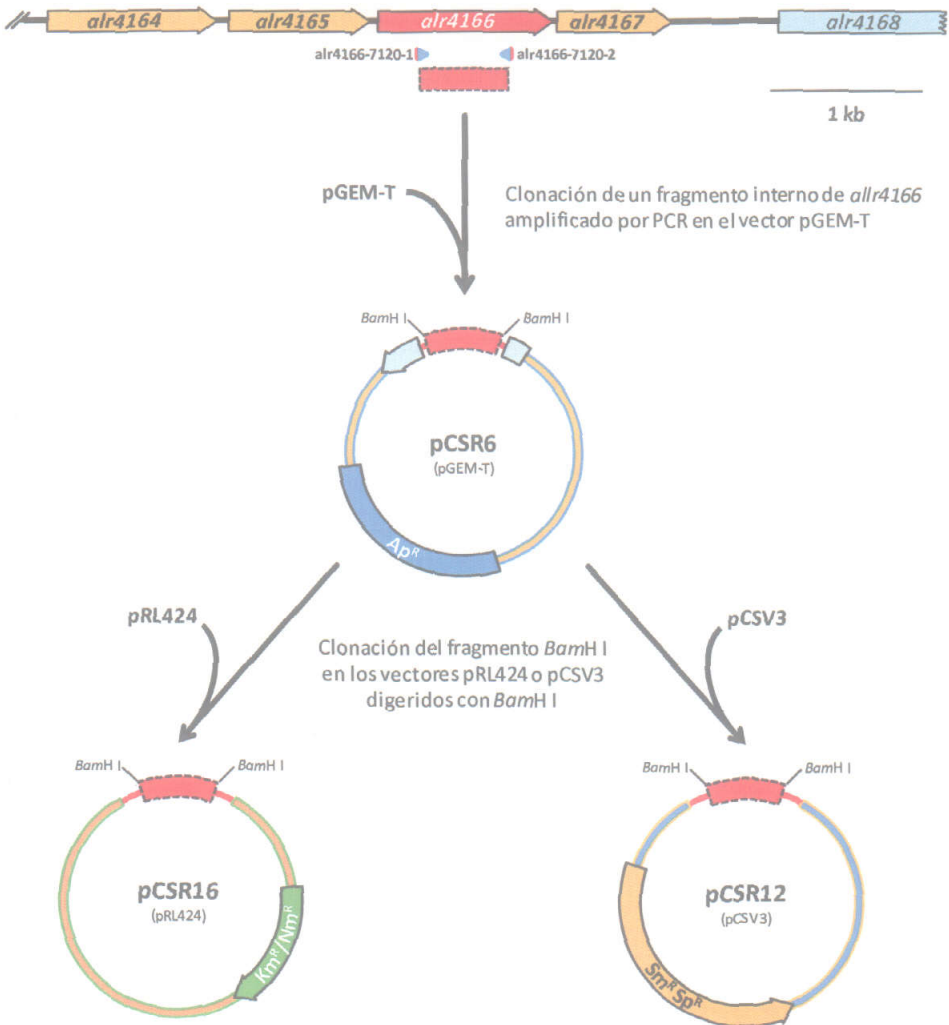


Figura 3.20. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR16 y pCSR12 para la inactivación de *alr4166*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH* I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se estudió mediante análisis de Southern en varios clones seleccionados resultantes de cada conjugación. El DNA se digería con la enzima de restricción *EcoR* V y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr4166*, obtenido por restricción con *BamH* I del plásmido pCSR6, que se empleó para la generación de los mutantes CSR8a y CSR8b (Figura 3.21A). En el análisis se esperaba una banda de 2,8 kb en la estirpe silvestre, de 5,9 kb en los clones que tuvieran insertado en *alr4166* el plásmido pCSR16 y de 6,8 kb en los clones que hubieran incorporado en dicha ORF el plásmido pCSR12 (Figura 3.21B). Estos análisis permitieron comprobar que la inserción de dichos plásmidos se había producido correctamente mediante recombinación simple interrumpiendo la ORF *alr4166* en los clones seleccionados, y que los cromosomas mutantes resultantes se encontraban completamente segregados en ambos casos. Uno de los clones seleccionados con la construcción

derivada del vector pCSV3 pasó a denominarse estirpe CSR8a, y otro de los que contenía la construcción derivada del vector pRL424 se denominó estirpe CSR8b.

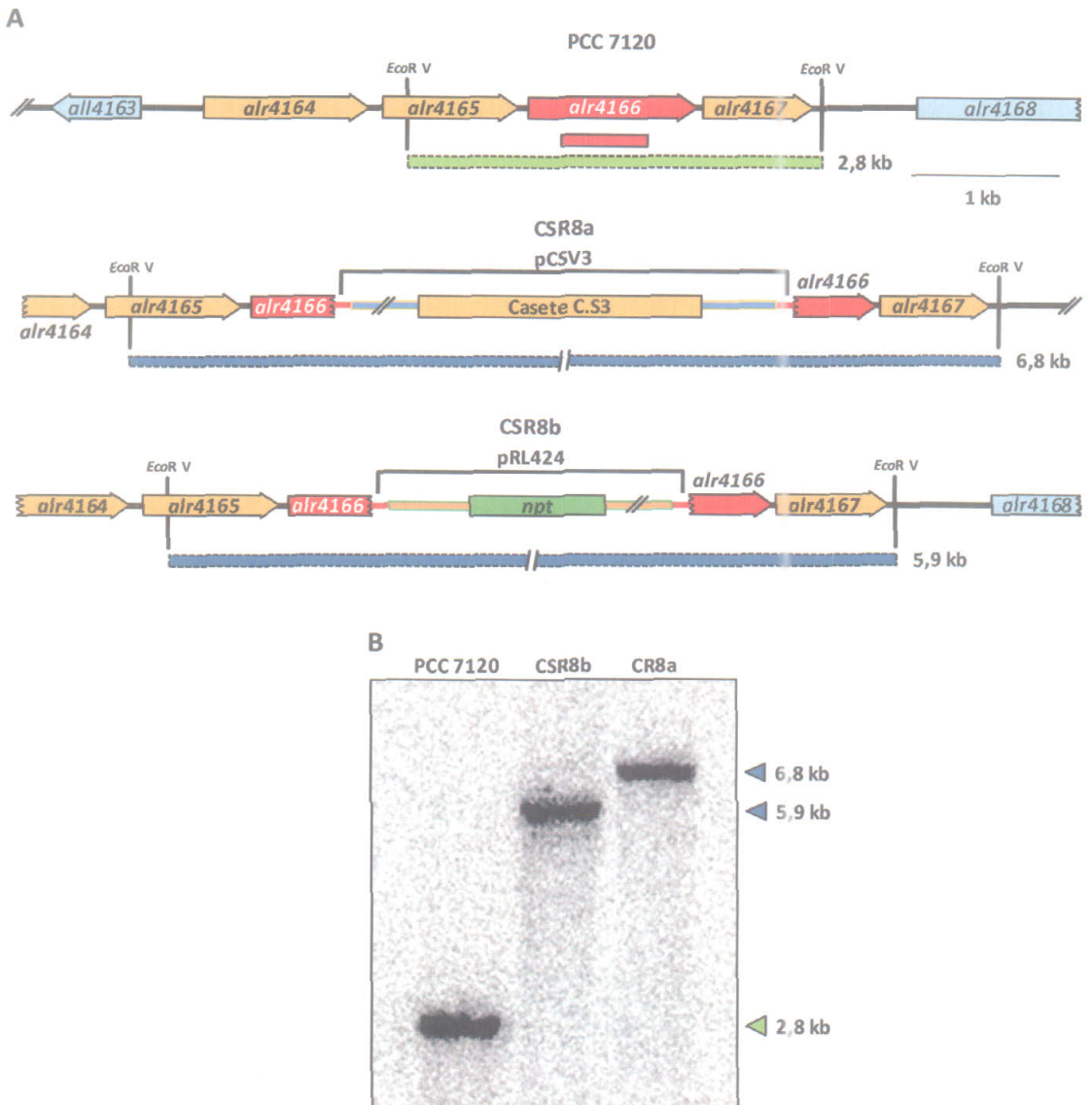


Figura 3.21. Estructura cromosómica de las estirpes CSR8a y CSR8b en la región de la ORF *alr4166*. A, representación esquemática de la región cromosómica que contiene la ORF *alr4166* de la estirpe silvestre y los mutantes CSR8a y CSR8b. Se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente a los vectores pCSV3 o pRL424 en el genoma de las estirpes mutantes, las dianas de restricción *EcoR V*, la localización de la sonda empleada y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre (barra verde), CSR8a y CSR8b (barras azules) en el análisis de Southern. B, resultado del análisis de Southern para determinar la segregación de las estirpes CSR8a y CSR8b. Se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulo verde) y los mutantes (triángulos azules).

Para la inactivación de la ORF *alr4164* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 537 pb, utilizando para ello DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *alr4164-7120-1* y *alr4164-7120-2*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH I* (Figura 3.22; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T Easy, generándose el plásmido pCSR51, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH I*, y el fragmento interno de *alr4164* con los extremos *BamH I* se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR60. Dicho plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Nm.

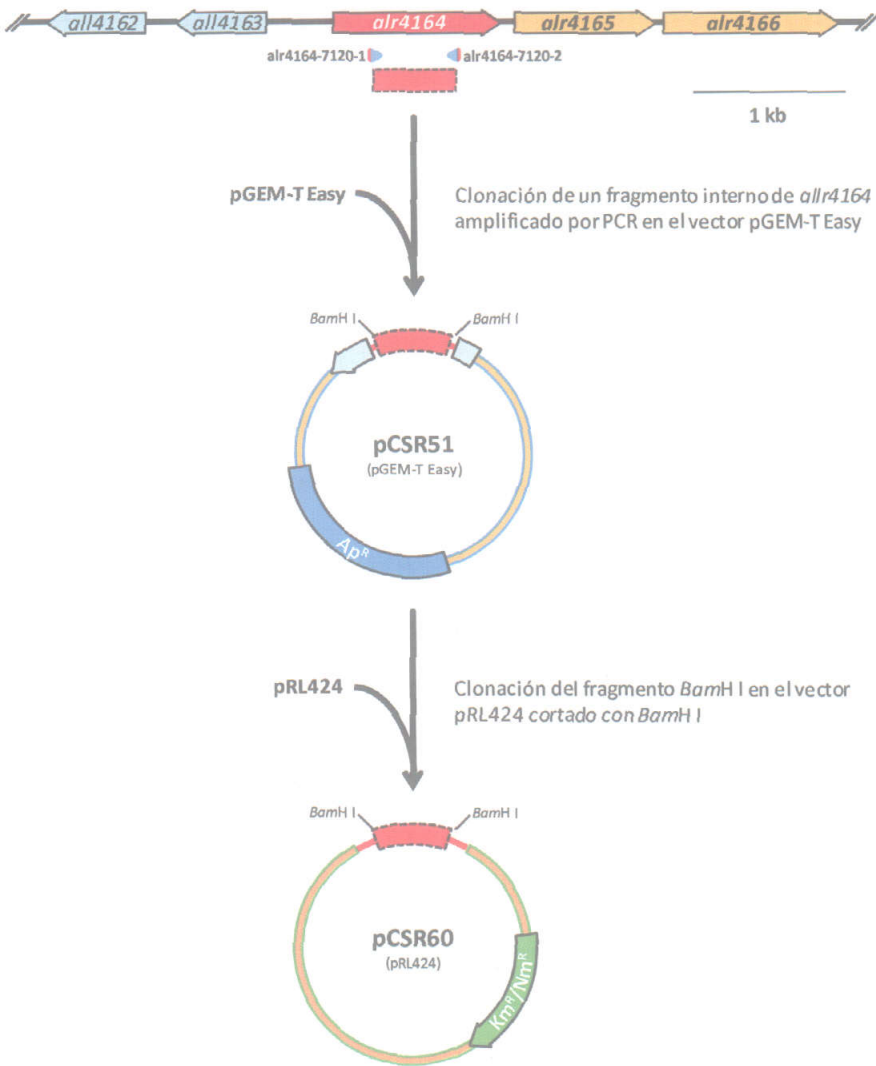


Figura 3.22. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR60. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH* I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se estudió mediante análisis de Southern en varios clones seleccionados resultantes de la conjugación. El DNA se digería con la endonucleasa *Dra* I y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr4164*, obtenido por restricción con *BamH* I del plásmido pCSR51, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.23A). En el análisis se esperaba una banda de 3,3 kb en la estirpe silvestre y de 6,4 kb en los clones que tuvieran insertado en *alr4164* el plásmido transferido (Figura 3.23B). Estos análisis permitieron comprobar que la inserción del vector se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *alr4164* y que no quedaban cromosomas silvestres en los clones seleccionados, de los cuales se tomó uno que pasó a denominarse estirpe CSR17.

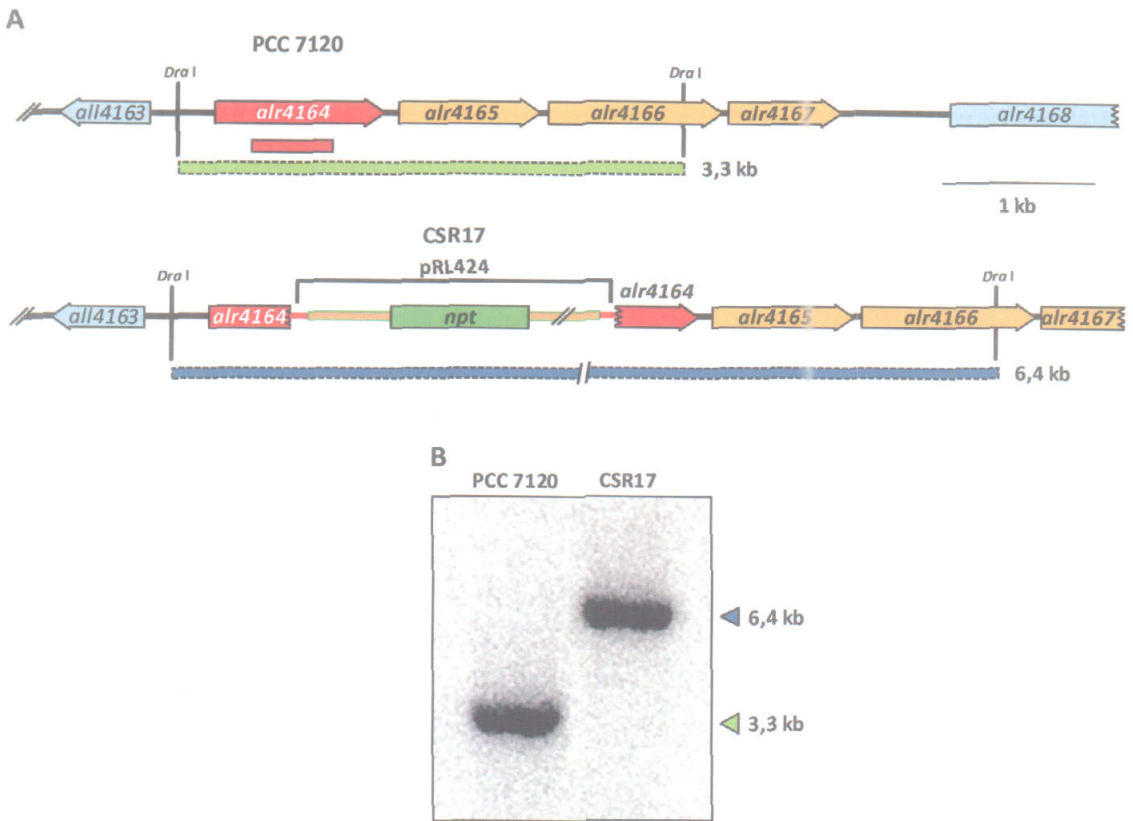


Figura 3.23. Estructura cromosómica de la estirpe CSR17 en la región de la ORF *alr4164*. A, región cromosómica que contiene la ORF *all4164* de las estirpes silvestre y CSR17. Se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de la estirpe mutante, el fragmento correspondiente a la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja), las dianas de restricción *Dra* I y el tamaño de las bandas esperadas de la estirpe silvestre (barra verde) y CSR17 (barra azul). B, análisis de Southern de la estructura genómica y segregación del exconjugante CSR17. Se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulo verde) y mutante (triángulo azul).

3.1.3.2. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSR17, CSR8a y CSR8b.

Para averiguar si el agrupamiento génico *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA* determinaba un sistema de transporte implicado en la incorporación de aminoácidos y, en caso afirmativo, si pudiera corresponder al sistema de transporte de aminoácidos neutros N-II de *Anabaena* sp. PCC 7120, se realizaron una serie de ensayos de transporte de aminoácidos comparando los mutantes CSR17 (*alr4164::pRL424*), CSR8a (*alr4166::pCSV3*) y CSR8b (*alr4166::pRL424*) con la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 3.4).

Al igual que se había observado en los ensayos de transporte de aminoácidos con el mutante *bgtA* (véase el apartado 3.1.2.2), los mutantes CSR17, CSR8b y CSR8a también mostraban una actividad de transporte de Asp muy baja y estaban afectados en el transporte de Glu (Figura 3.24). Sin embargo, no presentaban deficiencias en el transporte de aminoácidos básicos o éstas eran menos significativas que en la estirpe CSR10 (*bgtA::pCSV3*). Asimismo, en la estirpe mutante CSR17 se observaba un aumento de la actividad de transporte de His. Es interesante indicar que en los mutantes de la ORF *alr4166* la actividad de transporte de aminoácidos básicos era menor en el caso de la inactivación por inserción del vector pCSV3 que por inserción del vector pRL424 (estirpes CSR8a y CSR8b, respectivamente; Figura 3.24), lo cual se puede explicar por la presencia de terminadores de la transcripción en la casete de resistencia C.S3 del vector pCSV3. Estos resultados confirmaban que *alr4164* y *alr4166* determinan elementos de un transportador de aminoácidos ácidos (principalmente Asp), mientras que el efecto negativo sobre la actividad de transporte de aminoácidos básicos podría deberse a un efecto polar parcial de las inserciones sobre la expresión del gen *bgtA*, localizado detrás de *alr4166*. Así pues, estos

resultados sugieren que el agrupamiento génico completo *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA* se comportaría como un operón, existiendo también una expresión independiente del gen *bgtA*.

Tabla 3.4. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR17, CSR8a y CSR8b. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSR17, CSR8a y CSR8b cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis la ORF o el nombre del gen inactivado. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·[10 min] ⁻¹)			
	PCC 7120	CSR17 (<i>alr4164</i>)	CSR8b (<i>alr4166</i>)	CSR8a (<i>alr4166</i>)
Básicos				
L-Arg	125 ± 1,59 (25)	113 ± 5,46 (5)	105 ± 7,50 (5)	90,2 ± 4,92 (5)
L-Lys	138 ± 1,55 (16)	137 ± 10,0 (5)	126 ± 7,62 (5)	101 ± 3,71 (5)
L-His	88,0 ± 1,10 (16)	105 ± 4,62 (5)	87,8 ± 2,34 (5)	91,5 ± 2,43 (5)
Ácidos				
L-Asp	37,3 ± 0,39 (27)	2,33 ± 0,06 (6)	2,21 ± 0,07 (6)	1,97 ± 0,07 (6)
L-Glu	10,5 ± 0,12 (25)	8,36 ± 0,43 (5)	7,88 ± 0,39 (4)	7,20 ± 0,94 (3)
Neutros polares				
L-Gln	99,4 ± 0,90 (30)	117 ± 6,33 (5)	144 ± 9,70 (5)	135 ± 13,9 (5)
L-Ser	218 ± 2,50 (10)	223 ± 6,04 (4)	226 ± 12,5 (5)	207 ± 5,71 (4)
Hidrofóbicos				
Gly	200 ± 3,30 (15)	245 ± 6,96 (5)	175 ± 7,24 (5)	185 ± 6,52 (5)
L-Ala	192 ± 1,09 (20)	181 ± 3,69 (5)	180 ± 7,64 (5)	173 ± 6,03 (4)
L-Leu	103 ± 0,99 (17)	180 ± 7,79 (6)	174 ± 10,3 (5)	192 ± 8,46 (5)
Aromáticos				
L-Phe	118 ± 1,87 (16)	163 ± 8,70 (5)	161 ± 2,38 (21)	158 ± 8,47 (5)
Únicos				
L-Pro	135 ± 1,99 (16)	186 ± 12,4 (4)	217 ± 1,60 (17)	202 ± 10,6 (5)

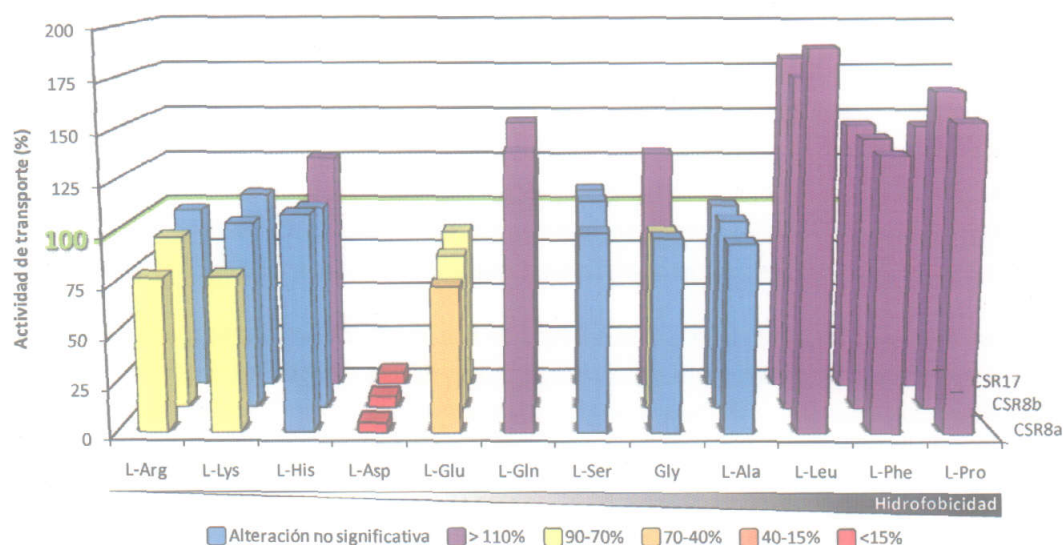


Figura 3.24. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSR17, CSR8a y CSR8b. Las actividades de transporte de los mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

Por otra parte, las estirpes mutantes CSR17, CSR8b y CSR8a no mostraban deficiencias en el transporte de aminoácidos neutros en general, pero sí presentaban actividades de transporte más elevadas que las observadas en la estirpe silvestre para algunos aminoácidos de este tipo, como Gln y

Gly (Figura 3.24). Estos datos se tratarán con mayor detalle en el apartado 3.2. Asimismo, en estos tres mutantes se observaba un aumento de la actividad de transporte de los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Phe y Pro con respecto a la estirpe silvestre, que era superior al que mostraba la estirpe CSR10 (Figura 3.18).

3.2. Estudio global de los sistemas de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Los sistemas de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120 descritos hasta el momento se han caracterizado analizando cada transportador individualmente. Sin embargo, para alcanzar una visión general del transporte de aminoácidos en esta cianobacteria se hizo necesaria la generación de mutantes que estuvieran afectados simultáneamente en varios de los sistemas caracterizados. En una tesis doctoral anterior de este grupo de investigación se generaron dos mutantes dobles de los sistemas de transporte N-I y Bgt al combinar, por un lado, la mutación de los genes *natA* y *bgtB* en una misma estirpe, denominada CSS10, y, por otro, la mutación de los genes *natC* y *bgtB* en otra estirpe, denominada CSS11 (Picossi, 2003). Los mutantes CSS10 y CSS11 se caracterizaron en cuanto a su capacidad de transporte de aminoácidos, observándose en los dos casos una actividad muy reducida para los aminoácidos básicos Arg y Lys y para los aminoácidos neutros Gly, Ala, Leu y Pro (Picossi, 2003). Por otra parte, el transporte de His, Ser y Gln estaba afectado sólo parcialmente, siendo menos acusado el defecto para este último aminoácido.

3.2.1. Generación y caracterización de mutantes dobles de los sistemas N-I y N-II.

Con objeto de profundizar en el papel del agrupamiento génico *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA*, se generaron dos mutantes dobles afectados en el sistema N-I y en un elemento de dicho agrupamiento de genes. Por un lado se generó un mutante doble *natB alr4164*, afectado en la proteína periplásmica de unión de sustrato del sistema de transporte N-I (véase el apartado 3.1.1) y en la proteína periplásmica del agrupamiento génico estudiado y, por otro lado, un mutante doble *natA alr4166*, afectado en una ATPasa del transportador N-I (véase el apartado 3.1.1) y en una subunidad transmembrana del sistema de transporte determinado por el agrupamiento de genes analizado.

Para la generación del mutante doble *natA alr4166* se utilizó como parental el mutante CSX60 (*natA::C.S3*), al que se transfirió por conjugación el plásmido pCSR16, descrito en el apartado 3.1.3.1 (Figura 3.20), seleccionándose colonias resistentes a los antibióticos Sm, Sp y Nm, que habrían incorporado la construcción transferida. Por otra parte, para la generación del mutante doble *natB alr4164* se utilizó como parental la estirpe CSS6 (*natB::C.S3*), a la que se transfirió mediante conjugación el plásmido pCSR60, descrito en el apartado 3.1.3.1 (Figura 3.22), seleccionándose colonias resistentes a Sm, Sp y Nm.

La estructura cromosómica en las nuevas regiones alteradas se analizó mediante Southern en varios clones seleccionados resultantes de cada conjugación. En el caso del mutante doble *natA alr4166*, el DNA se digería con la endonucleasa *EcoR* V y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr4166*, obtenido por restricción con *BamH* I del plásmido pCSR6, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.25A). En este análisis se esperaba una banda de 2,8 kb en la estirpe silvestre y de 5,9 kb en los clones que tuvieran insertado en la ORF *alr4166* el plásmido transferido (Figura 3.25C). Por otra parte, en el caso del mutante doble *natB alr4164* el DNA se digería con la enzima de restricción *Dra* I y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr4164*, obtenido por restricción con *BamH* I del plásmido pCSR51, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.25B). En este análisis se esperaba una banda de 3,3 kb en la estirpe silvestre y de 6,4 kb en los clones que tuvieran insertado en la ORF *alr4164*

el plásmido transferido (Figura 3.25D). Estos análisis permitieron comprobar que la inserción de cada plásmido transferido se había producido correctamente interrumpiendo la ORF correspondiente en los clones seleccionados y que los cromosomas mutantes resultantes estaban completamente segregados. Uno de los clones seleccionados con la inserción en la ORF *alr4166* pasó a denominarse estirpe CSX60-R8b, y otro de los que contenían la inserción en la ORF *alr4164* se denominó estirpe CSS6-R17.

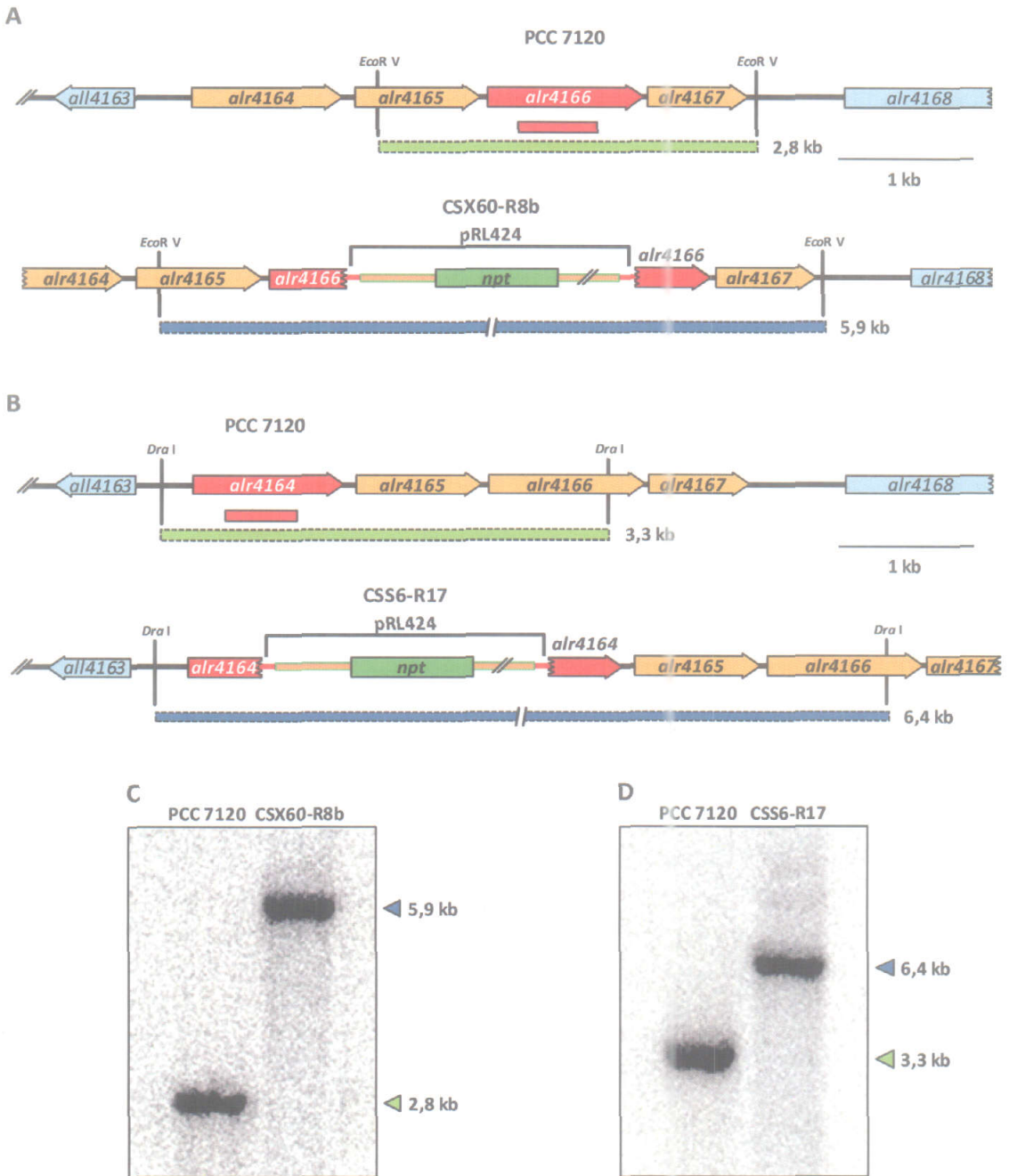


Figura 3.25. Estructura cromosómica de los mutantes dobles CSS6-R17 y CSX60-R8b en la región del agrupamiento génico *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA*. **A**, región cromosómica de las estirpes silvestre y CSX60-R8b que contiene la ORF *alr4166*. **B**, esquema de la región genómica de la estirpe silvestre PCC 7120 y del mutante CSS6-R17 que contiene la ORF *alr4164*. En los paneles A y B, se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de las estirpes mutantes, el fragmento correspondiente a la sonda utilizada en el análisis de Southern (barra roja), las dianas de restricción *EcoR V* y *Dra I* y el tamaño de las bandas esperadas de las estirpes silvestre (barras verdes) y mutantes (barras azules). **C**, resultado del análisis de Southern de la estructura genómica del exconjugante CSX60-R8b para determinar la segregación. **D**, análisis de Southern de la estructura genómica y segregación del exconjugante CSS6-R17. En los paneles C y D, se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulos verdes) y los mutantes (triángulos azules).

Se realizaron una serie de ensayos de transporte de aminoácidos comparando los mutantes dobles CSS6-R17 (*natB::C.S3 alr4164::pRL424*) y CSX60-R8b (*natA::C.S3 alr4166::pCSV3*) con sus respectivas estirpes parentales CSS6 (*natB::C.S3*) y CSX60 (*natA::C.S3*), descritas en el apartado 3.1.1.1, y la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 3.5). Los mutantes dobles CSS6-R17 y CSX60-R8b mostraban actividades de transporte de aminoácidos ácidos y neutros muy bajas (Figura 3.26), siendo especialmente notable el bajo transporte de los aminoácidos Gln, Asp y Glu cuando se compararon con sus estirpes parentales CSS6 (*natB*) y CSX60 (*natA*), respectivamente. Hay que indicar que la deficiencia que se observaba en el transporte de los aminoácidos básicos Arg y Lys podría deberse a un efecto polar parcial en la expresión de *bgtA*, tal como se describió para las estirpes CSR8b y CSR8a en el apartado 3.1.3.2. Estos resultados permiten concluir que el agrupamiento génico *alr4164-alr4165-alr4166-bgtA* determina el sistema de transporte N-II de *Anabaena* sp. PCC 7120, siendo responsable de la actividad remanente de transporte de aminoácidos neutros que se observa en los mutantes de la permeasa N-I (véase el apartado 3.1.1) (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Por otro lado, este sistema de transporte constituye la principal vía de entrada de Asp en esta cianobacteria. Con respecto al Glu, éste parece ser transportado a través de los dos sistemas, N-I y N-II.

Tabla 3.5. Actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes CSS6-R17 y CSX60-R8b. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de las estirpes mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 µM. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Se muestran las actividades de transporte de las estirpes parentales de los mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b, CSS6 y CSX60, respectivamente, para facilitar su comparación. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis la ORF o el gen inactivado. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·[10 min] ⁻¹)				
	PCC 7120	CSS6 (<i>natB</i>)	CSS6-R17 (<i>natB alr4164</i>)	CSX60 (<i>natA</i>)	CSX60-R8b (<i>natA alr4166</i>)
Básicos					
L-Arg	125 ± 1,59 (25)	135 ± 8,81 (6)	106 ± 5,72 (5)	133 ± 8,48 (7)	102 ± 1,15 (16)
L-Lys	138 ± 1,55 (16)	165 ± 10,4 (6)	108 ± 4,38 (5)	188 ± 7,99 (7)	121 ± 2,05 (17)
L-His	88,0 ± 1,10 (16)	102 ± 3,97 (6)	62,9 ± 3,68 (5)	69,8 ± 1,47 (7)	56,7 ± 2,13 (9)
Ácidos					
L-Asp	37,3 ± 0,39 (27)	64,1 ± 4,01 (7)	1,08 ± 0,10 (6)	56,3 ± 0,47 (25)	0,99 ± 0,04 (10)
L-Glu	10,5 ± 0,12 (25)	25,6 ± 1,28 (6)	1,19 ± 0,20 (5)	16,2 ± 1,29 (7)	0,39 ± 0,05 (9)
Neutros polares					
L-Gln	99,4 ± 0,90 (30)	122 ± 4,65 (5)	6,66 ± 0,73 (5)	76,0 ± 0,53 (22)	6,14 ± 0,24 (9)
L-Ser	218 ± 2,50 (10)	55,1 ± 3,53 (5)	13,6 ± 0,74 (4)	50,8 ± 4,45 (6)	7,37 ± 0,50 (8)
Hidrofóbicos					
Gly	200 ± 3,30 (15)	18,1 ± 2,01 (5)	5,31 ± 1,99 (4)	17,9 ± 1,62 (6)	3,98 ± 0,63 (6)
L-Ala	192 ± 1,09 (20)	35,1 ± 3,32 (3)	3,17 ± 0,28 (5)	39,3 ± 0,89 (6)	4,16 ± 0,21 (7)
L-Leu	103 ± 0,99 (17)	4,70 ± 0,33 (5)	1,71 ± 0,31 (6)	4,74 ± 0,39 (6)	1,24 ± 0,05 (8)
Aromáticos					
L-Phe	118 ± 1,87 (16)	4,30 ± 0,36 (5)	2,02 ± 0,24 (4)	4,18 ± 0,23 (6)	3,22 ± 0,21 (8)
Únicas					
L-Pro	135 ± 1,99 (16)	0,66 ± 0,12 (4)	1,05 ± 0,08 (4)	1,57 ± 0,17 (5)	1,06 ± 0,18 (7)

Mientras que la inactivación del sistema N-I permite una actividad de transporte de aminoácidos ácidos similar, o incluso superior, a la de la estirpe silvestre (Figura 3.3 y Figura 3.12), la inactivación del sistema N-II permite una actividad de transporte similar, o incluso más elevada que en la estirpe silvestre, de la mayoría de los aminoácidos neutros ensayados (Figura 3.24). Dado que el sistema de transporte N-I está codificado en los genes *natA* a *natE*, las ORFs del sistema de transporte N-II se han denominado *natF* (*alr4164*), *natG* (*alr4165*) y *natH* (*alr4166*).

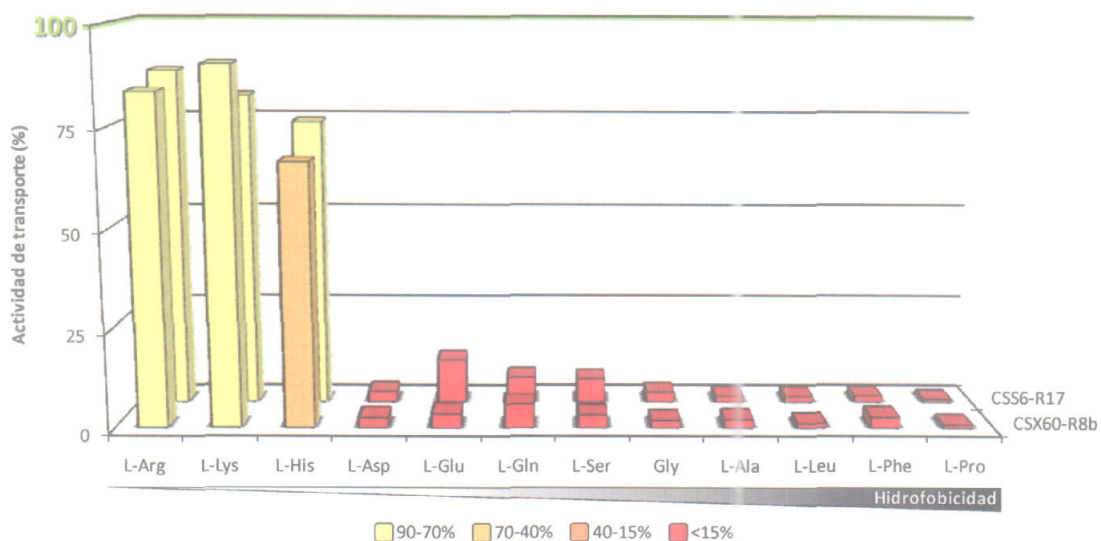


Figura 3.26. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b. Las actividades de transporte de las estirpes mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

Así pues, el sistema de transporte N-II de *Anabaena* sp. PCC 7120 estaría constituido por, al menos, cuatro subunidades diferentes, una de las cuales sería una subunidad de unión de ATP, determinada por el gen *bgtA*, otras dos serían subunidades transmembrana, determinadas por los genes *natG* y *nath*, y la subunidad restante sería una proteína periplásmica de unión de sustrato, determinada por el gen *natF*. A esta permeasa podría contribuir más de una proteína periplásmica de unión de sustrato, como ocurre con algunos sistemas de transporte de tipo ABC.

Estos resultados han permitido determinar qué aminoácidos se transportan a través de los sistemas de transporte N-I y N-II en *Anabaena* sp. PCC 7120. Así, el sistema N-I es el responsable de la incorporación de aminoácidos hidrofóbicos, entre ellos Pro, Phe, Leu, Ala y Gly, neutros polares, como Gln y Ser, el aminoácido ácido Glu y, de forma parcial, His. Por su parte, el sistema de transporte N-II constituye una vía de entrada de Ala y Gly, aminoácidos neutros polares, como Gln y Ser, y aminoácidos ácidos, si bien puede transportar también pequeñas trazas del resto de aminoácidos que son incorporados por medio del sistema N-I.

3.2.2. Generación y caracterización de un mutante N-I N-II Bgt.

Los resultados descritos anteriormente apuntan a que un transportador constituido por las proteínas BgtA y BgtB sea el responsable de la mayor parte de la actividad de transporte de aminoácidos básicos que se observa en las condiciones experimentales ensayadas, y que dos transportadores independientes (N-I: NatABCDE; N-II: NatFGH-BgtA) sean los responsables de la mayor parte de la actividad de transporte de aminoácidos neutros y ácidos, siendo BgtA una ATPasa compartida por los sistemas Bgt y N-II. Se decidió generar un mutante doble *natA bgtA*, que debería carecer prácticamente de actividad de transporte de aminoácidos, ya que fenotípicamente sería un mutante de los tres transportadores.

Para generar un mutante doble *natA bgtA* se utilizó como parental la estirpe CSX60 (*natA::C.S3*), en la que se pretendía inactivar el gen *bgtA*, para lo que fue necesario construir un nuevo plásmido derivado del vector pRL424 con un fragmento interno de dicho gen. Este nuevo plásmido se generó partiendo del plásmido pCSR35, utilizado para la generación del mutante CSR10 (*bgtA::pCSV3*), que estaba constituido por un fragmento interno del gen *bgtA* clonado en el vector pGEM-T Easy (véase el

apartado 3.1.2.1; Figura 3.16). Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *BamH* I, y el fragmento interno de *bgtA* con los extremos *BamH* I resultante se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose así el plásmido pCSR39 (Figura 3.27). Dicho plásmido se transfirió mediante conjugación a la estirpe mutante CSX60, seleccionándose colonias resistentes a Sm, Sp y Nm, que habrían incorporado la construcción transferida mediante recombinación simple.

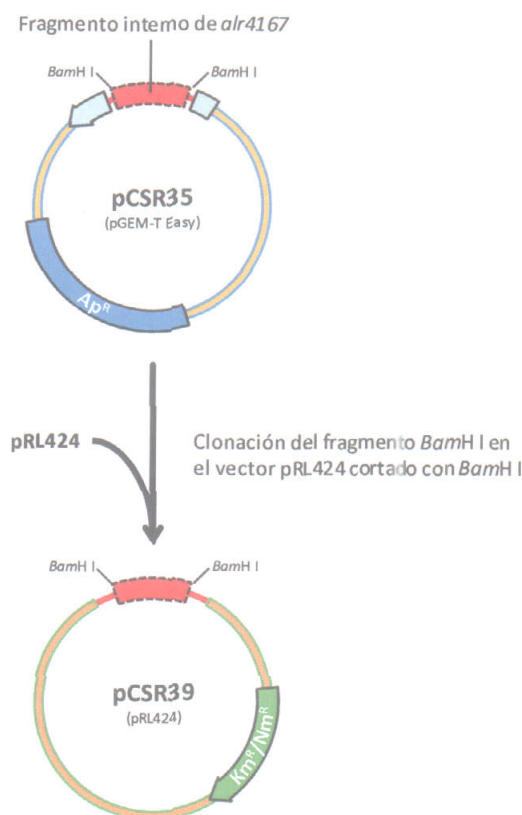


Figura 3.27. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR39. Se señalan las dianas de restricción relevantes y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la nueva región alterada se analizó mediante PCR en varios clones seleccionados resultantes de la conjugación, utilizando para ello DNA genómico de las estirpes analizadas como molde y las parejas de oligonucleótidos *alr4167-7120-5/alr4167-7120-6* y *alr4166-7120-3/alr4166-7120-4* como cebadores (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 613 pb en la estirpe silvestre y de 3.720 pb en los clones que tuvieran insertado en *bgtA* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 763 pb (Figura 3.28). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia del gen *nath*, localizado delante de *bgtA*. Este análisis permitió comprobar que la inserción del plásmido transferido había tenido lugar correctamente interrumpiendo el gen *bgtA* y que no quedaban cromosomas silvestres en el clon seleccionado, que pasó a denominarse estirpe CSX60-R10.

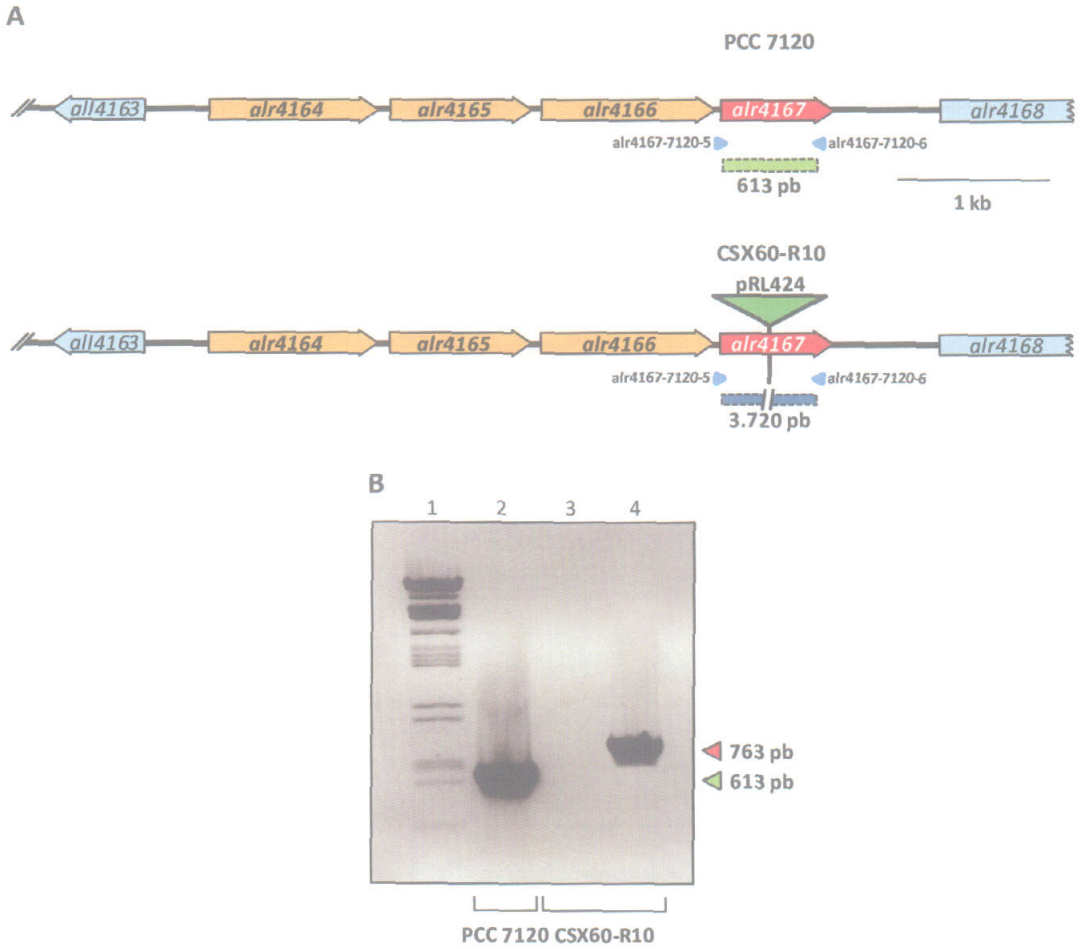


Figura 3.28. Estructura cromosómica del mutante doble CSX60-R10 en la región del gen *bgtA*. A, representación esquemática de la región cromosómica de las estirpes PCC 7120 y CSX60-R10 que contiene el gen *bgtA*. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y CSX60-R10. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de la estirpe CSX60-R10. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos alr4167-7120-5/alr4167-7120-6 para las estirpes silvestre y mutante, respectivamente (triángulo verde), y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control alr4166-7120-3/alr4166-7120-4 para la estirpe mutante (triángulo rojo).

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de aminoácidos comparando la estirpe CSX60-R10 con la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 3.6). Como se esperaba, la estirpe CSX60-R10 mostraba una actividad de transporte muy baja de todos los aminoácidos ensayados, incluidos los aminoácidos básicos Arg y Lys, para los que la actividad de transporte estaba sólo ligeramente afectada en las estirpes CSS6-R17 y CSX60-R8b (Figura 3.29). En general, las actividades de transporte que estaban muy afectadas en los mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b eran similares o incluso inferiores en el mutante CSX60-R10.

Un resultado interesante es que la actividad de transporte de Gln remanente que se observaba en las estirpes CSS6-R17 y CSX60-R8b se perdía en la estirpe CSX60-R10, lo que indicaba que el transportador Bgt también contribuye a la actividad de transporte de este aminoácido. Este resultado concordaba con la deficiencia en el transporte de Gln que se observaba en los mutantes CSS8 y CSR10 del sistema Bgt (véase el apartado 3.1.2.2). Asimismo, la His también se transporta en una gran proporción a través del sistema de transporte de aminoácidos básicos Bgt, dado que el transporte de este aminoácido que se observaba en los mutantes CSS6-R17 y CSX60-R8b, de un 60-70% respecto de la estirpe silvestre, se perdía en gran medida en el mutante CSX60-R10. Estos resultados indicaban que

este aminoácido también puede ser transportado a través de los tres sistemas descritos. No obstante, en la estirpe mutante CSX60-R10 todavía se observaba un pequeño porcentaje de actividad de transporte de algunos aminoácidos, incluyendo His (2,5%), Asp (2,4%) y Glu (3,8%), sugiriendo que en *Anabaena* sp. PCC 7120 podrían expresarse sistemas de transporte de aminoácidos adicionales con una baja actividad en las condiciones de ensayo utilizadas.

Tabla 3.6. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe CSX60-R10. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de la estirpe mutante CSX60-R10 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se incubaron durante 10 min con los [14 C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μ M. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles \cdot (mg Chl) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Se muestran las actividades de transporte de los mutantes dobles CSS6-R17 y CSX60-R8b para facilitar su comparación. Para cada estirpe mutante se indican entre paréntesis los genes inactivados. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividad de transporte de aminoácidos (nmoles \cdot (mg Chl) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$)			
	PCC 7120	CSS6-R17 (<i>natB natF</i>)	CSX60-R8b (<i>natA natH</i>)	CSX60-R10 (<i>natA bgtA</i>)
Básicos				
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	106 \pm 5,72 (5)	102 \pm 1,15 (16)	0,45 \pm 0,23 (2)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	108 \pm 4,38 (5)	121 \pm 2,05 (17)	0,45 \pm 0,15 (4)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	62,9 \pm 3,68 (5)	56,7 \pm 2,13 (9)	2,20 \pm 0,09 (3)
Ácidos				
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	1,08 \pm 0,10 (6)	0,99 \pm 0,04 (10)	0,89 \pm 0,09 (5)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	1,19 \pm 0,20 (5)	0,39 \pm 0,05 (9)	0,40 \pm 0,13 (4)
Neutros polares				
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	6,66 \pm 0,73 (5)	6,14 \pm 0,24 (9)	0,70 \pm 0,07 (4)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	13,6 \pm 0,74 (4)	7,37 \pm 0,50 (8)	3,54 \pm 0,50 (4)
Hidrofóbicos				
Gly	200 \pm 3,30 (15)	5,31 \pm 1,99 (4)	3,98 \pm 0,63 (6)	1,64 \pm 0,24 (4)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	3,17 \pm 0,28 (5)	4,16 \pm 0,21 (7)	1,73 \pm 0,42 (4)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	1,71 \pm 0,31 (6)	1,24 \pm 0,05 (8)	0,81 \pm 0,04 (4)
Aromáticos				
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	2,02 \pm 0,24 (4)	3,22 \pm 0,21 (8)	1,43 \pm 0,11 (4)
Únicos				
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	1,05 \pm 0,08 (4)	1,06 \pm 0,18 (7)	0,97 \pm 0,16 (4)

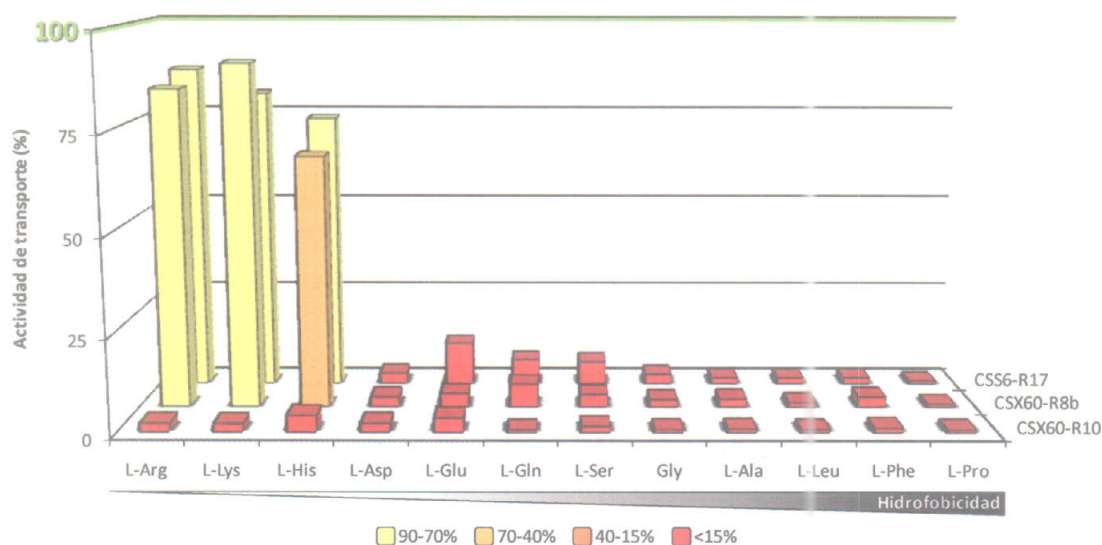


Figura 3.29. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSX60-R10. Las actividades de transporte de los mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada. Se incluyen los mutantes dobles CSS6-R17 y CSX60-R8b para facilitar su comparación.

3.2.3. Actividades de transporte de aminoácidos en ensayos de competencia.

Para caracterizar mejor los sistemas de transporte de *Anabaena* sp. PCC 7120 estudiados en este trabajo, se llevaron a cabo ensayos de competencia. Estos ensayos de transporte pueden proporcionar información de los aminoácidos que pueden ser reconocidos, aunque no necesariamente transportados, por las permeasas.

La actividad de transporte del sistema Bgt se ensayó utilizando como sustrato [^{14}C]Arg o [^{14}C]Lys en el mutante CSX60-R8b (*nata nath*), estirpe que carece de los sistemas de transporte N-I y N-II. Utilizando como aminoácidos competidores cada uno de los 19 L-aminoácidos y glicina no marcados a concentración 10 ó 100 veces superior a la del aminoácido radiactivo, sólo se observaba una inhibición significativa de la actividad de transporte con los aminoácidos básicos, incluyendo His (Tabla 3.7). Los resultados indican una afinidad ligeramente mayor del sistema Bgt para Arg que para Lys, lo que es consistente con los resultados publicados previamente (Herrero y Flores, 1990). Sin embargo, no se observaba inhibición con Gln, indicando que este aminoácido es reconocido por el sistema Bgt de forma más débil que la Arg o la Lys.

Tabla 3.7. Actividades de transporte de Arg y Lys en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSX60-R8b. Suspensiones celulares de la estirpe CSX60-R8b cultivada en medio BG11 suplementado con antibióticos se incubaron durante 10 min con los [^{14}C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM , en presencia de un aminoácido competidor no marcado a la concentración indicada (10x, 100 μM ; 100x, 1 mM), como se describe en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Las actividades de transporte se indican como el porcentaje de actividad con respecto al mismo ensayo en ausencia del aminoácido competidor. Los aminoácidos se presentan, de forma aproximada, con hidrofobicidad creciente de arriba a abajo (Tossi *et al.*, 2002).

Aminoácido competidor	Actividad de transporte (%)			
	L-[^{14}C]Arg [aminoácido competidor]		L-[^{14}C]Lys [aminoácido competidor]	
	10x	100x	10x	100x
Básicos				
L-Arg	-	-	4,0	0,2
L-Lys	23	3,2	-	-
L-His	99	67	93	46
Ácidos				
L-Asp	107	100	102	100
L-Glu	107	100	102	98
Neutros polares				
L-Asn	106	102	103	98
L-Gln	102	99	101	97
L-Ser	104	97	99	99
L-Thr	103	100	101	97
L-Cys	103	98	102	96
Hidrofóbicos				
Gly	105	99	101	98
L-Ala	105	101	101	99
L-Met	104	96	100	97
L-Val	102	99	99	98
L-Ile	107	100	101	98
L-Leu	104	102	100	101
Aromáticos				
L-Tyr	99	98	102	100
L-Trp	101	98	100	100
L-Phe	104	99	100	99
Únicos				
L-Pro	104	100	100	101

Por otra parte, el sistema de transporte N-I se ensayó utilizando como sustrato [^{14}C]Phe o [^{14}C]Pro en la estirpe CSR8b (*natH*), la cual carece del sistema de transporte N-II. Todos los aminoácidos neutros y la His (que es parcialmente neutra al pH de los ensayos) inhibían tanto el transporte de Phe como el de Pro (Tabla 3.8). Estos resultados corroboraban que el sistema de transporte N-I acepta aminoácidos neutros de forma general. Con respecto a los aminoácidos ácidos, no se observaba inhibición con Asp, mientras que el Glu a una concentración 100 veces superior a la del sustrato inhibía el transporte de Pro, lo que corroboraba que este sistema también puede reconocer Glu, aunque no Asp. Un resultado sorprendente fue que los aminoácidos básicos Arg y Lys también inhibían levemente el transporte de Phe y, de forma más notable, de Pro.

Tabla 3.8. Actividades de transporte de Phe y Pro en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSR8b. Suspensiones celulares de la estirpe CSR8b cultivada en medio BG11 suplementado con antibióticos se incubaron durante 10 min con los [^{14}C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM , en presencia de un aminoácido competidor no marcado a la concentración indicada (10x, 100 μM ; 100x, 1 mM), como se describe en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Las actividades de transporte se indican como el porcentaje de actividad con respecto al mismo ensayo en ausencia del aminoácido competidor. Los aminoácidos se presentan, de forma aproximada, con hidrofobicidad creciente de arriba a abajo (Tossi *et al.*, 2002).

Aminoácido competidor	Actividad de transporte (%)			
	L-[^{14}C]Phe		L-[^{14}C]Pro	
	[aminoácido competidor]	[aminoácido competidor]	[aminoácido competidor]	[aminoácido competidor]
	10x	100x	10x	100x
Básicos				
L-Arg	102	88	84	42
L-Lys	92	70	73	32
L-His	44	11	8,0	1,1
Ácidos				
L-Asp	102	103	102	96
L-Glu	103	92	92	52
Neutros polares				
L-Asn	67	25	20	3,9
L-Gln	43	9,3	10	2,1
L-Ser	21	7,2	7,4	2,2
L-Thr	27	8,7	8,9	2,6
L-Cys	27	5,9	9,7	1,7
Hidrofóbicos				
Gly	21	7,1	7,4	2,1
L-Ala	15	4,1	5,3	1,4
L-Met	18	4,2	6,2	1,2
L-Val	15	2,4	5,0	0,8
L-Ile	21	4,1	6,6	1,4
L-Leu	16	3,2	5,7	1,0
Aromáticos				
L-Tyr	34	7,2	8,6	2,5
L-Trp	38	8,6	7,3	1,5
L-Phe	-	-	5,2	0,9
Únicos				
L-Pro	57	18	-	-

Por último, el sistema N-II se ensayó utilizando como sustrato [^{14}C]Asp o [^{14}C]Gln en la estirpe CSX60 (*natA*), que carece del sistema de transporte N-I. En este caso, el transporte de Asp se inhibía sobre todo por los aminoácidos Asn, Cys y Gln y, en menor medida, por Glu, Ala, Gly y Thr (Tabla 3.9). En cuanto al transporte de Gln, éste estaba afectado de manera similar por los mismos aminoácidos fríos que inhibían el transporte de [^{14}C]Asp. Es de destacar que tanto para el transporte de Asp como de Gln no se observaba inhibición, o ésta era poco significativa, con aminoácidos básicos (Arg y Lys), Pro y aminoácidos aromáticos o alifáticos (salvo Gly, Ala y Met).

Tabla 3.9. Actividades de transporte de Asp y Gln en presencia de otros aminoácidos en el mutante CSX60. Suspensiones celulares de la estirpe CSX60 cultivada en medio BG11 suplementado con antibióticos se incubaron durante 10 min con los [^{14}C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM , en presencia de un aminoácido competidor no marcado a la concentración indicada (10x, 100 μM ; 100x, 1 mM), como se describe en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Las actividades de transporte se indican como el porcentaje de actividad con respecto al mismo ensayo en ausencia del aminoácido competidor. Los aminoácidos se presentan, de forma aproximada, con hidrofobicidad creciente de arriba a abajo (Tossi *et al.*, 2002).

Aminoácido competidor	Actividad de transporte (%)			
	L-[^{14}C]Asp [aminoácido competidor]		L-[^{14}C]Gln [aminoácido competidor]	
	10x	100x	10x	100x
Básicos				
L-Arg	102	102	100	98
L-Lys	103	101	100	100
L-His	72	25	43	15
Ácidos				
L-Asp	-	-	39	13
L-Glu	82	13	78	16
Neutros polares				
L-Asn	42	9,1	27	14
L-Gln	57	16	-	-
L-Ser	78	39	49	18
L-Thr	95	86	91	59
L-Cys	56	10	40	8,7
Hidrofóbicos				
Gly	98	81	88	54
L-Ala	93	72	77	34
L-Met	100	95	99	84
L-Val	85	42	56	33
L-Ile	97	97	96	89
L-Leu	101	93	96	79
Aromáticos				
L-Tyr	98	96	97	90
L-Trp	99	98	100	89
L-Phe	100	100	102	97
Únicos				
L-Pro	98	103	100	99

Estos resultados muestran que, mientras el sistema N-I reconoce aminoácidos hidrofóbicos, neutros polares, básicos (incluida la His) y el aminoácido ácido Glu, la permeasa N-II reconoce principalmente aminoácidos ácidos y neutros polares, aunque también detecta algunos aminoácidos hidrofóbicos, entre los que destacan Gly, Ala y Met. Por otra parte, el sistema Bgt reconoce aminoácidos básicos e His fundamentalmente, y el reconocimiento de Gln (véase el apartado 3.1.2.2) tiene lugar aparentemente con muy baja afinidad. Mientras que el sistema N-I constituiría una permeasa general de aminoácidos, al reconocer todos los aminoácidos excepto Asp, los transportadores Bgt y N-II serían sistemas más específicos de aminoácidos con características químicas definidas.

3.2.4. Actividades de transporte para aminoácidos no ensayados previamente.

Para la caracterización de los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt se había empleado una serie de 12 aminoácidos representativos de los diferentes grupos en los que éstos se clasifican atendiendo a sus propiedades químicas. Dado que los aminoácidos restantes que componen los 20 aminoácidos proteicos se habían estudiado sólo mediante ensayos de competencia (véase el apartado anterior), para determinar la posible existencia de nuevos transportadores de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 se decidió estudiar la actividad de transporte de algunos mutantes representativos de los sistemas N-I,

N-II y Bgt para una serie de aminoácidos no ensayados previamente. Esta nueva serie está constituida por los aminoácidos Asn y Thr (neutros polares), Met, Val e Ile (hidrofóbicos), y Tyr (aromático).

Los ensayos de transporte se llevaron a cabo inicialmente con los mutantes CSS6 y CSX60, ambos afectados en el sistema de transporte N-I, CSR17, CSR8a y CSR8b, afectados en el sistema de transporte N-II, y CSR10, afectado en los sistemas de transporte N-II y Bgt (Tabla 3.10; Figura 3.30).

Tabla 3.10. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe PCC 7120 y los mutantes CSS6, CSX60, CSR17, CSR8a, CSR8b y CSR10. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se indica en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de los mutantes CSS6, CSX60, CSR17, CSR8a, CSR8b y CSR10 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 10 μM. Las actividades de transporte se indican, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media calculadas a partir del número de ensayos que se indica entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis el nombre del gen inactivado.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·[10 min] ⁻¹)						
	PCC 7120	CSS6 (<i>natB</i>)	CSX60 (<i>natA</i>)	CSR17 (<i>natF</i>)	CSR8b (<i>natH</i>)	CSR8a (<i>natH</i>)	CSR10 (<i>bgtA</i>)
Neutros polares							
L-Asn	87,9 ± 1,97 (3)	20,5 (1)	31,7 (1)	124 (1)	112 (1)	65,3 (1)	77,9 (1)
L-Thr	88,9 ± 2,34 (3)	6,96 (1)	6,60 (1)	112 (1)	122 (1)	86,0 (1)	91,1 (1)
Hidrofóbicos							
L-Met	83,4 ± 1,67 (3)	17,0 (1)	21,8 (1)	115 (1)	123 (1)	85,3 (1)	81,6 (1)
L-Val	74,2 ± 0,86 (3)	1,43 (1)	1,77 (1)	101 (1)	105 (1)	92,1 (1)	77,5 (1)
L-Ile	63,6 ± 0,83 (3)	1,04 (1)	1,08 (1)	89,7 (1)	102 (1)	67,9 (1)	63,9 (1)
Aromáticos							
L-Tyr	68,5 (1)	2,10 (1)	2,41 (1)	85,7 (1)	114 (1)	80,8 (1)	69,9 (1)

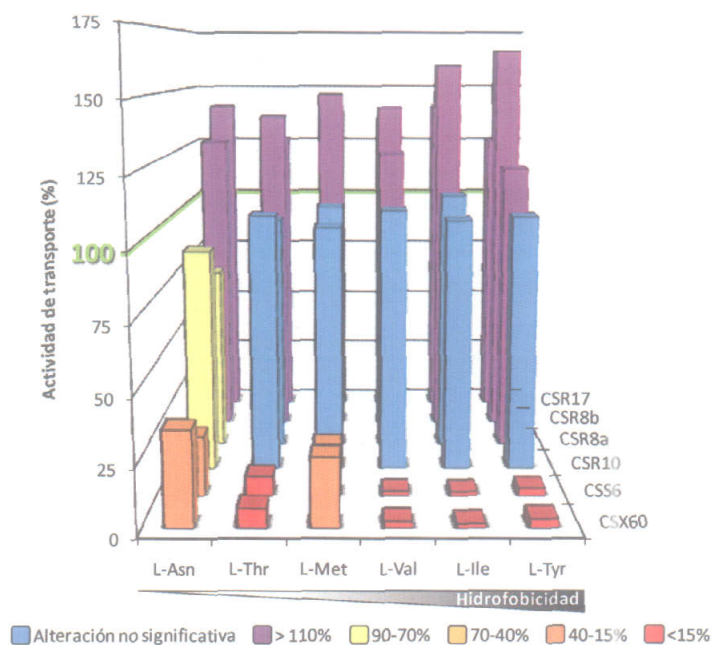


Figura 3.30. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSS6, CSX60, CSR17, CSR8b, CSR8a y CSR10. Las actividades de transporte de los mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

En los mutantes del sistema N-I el transporte estaba afectado para todos los aminoácidos ensayados, aunque la disminución en la actividad de transporte fue más acusada para Val, Ile y Tyr, que son aminoácidos hidrofóbicos y, en menor medida, Thr, Met y Asn, que son aminoácidos polares, salvo el aminoácido Met (Figura 3.30). Por otra parte, y a excepción de la Asn, cuyo transporte era ligeramente

inferior en los mutantes CSR8a y CSR10, el resto de los mutantes ensayados presentaba actividades de transporte superiores a las de la estirpe silvestre en la mayoría de los casos, fenotipo que se había observado ya con otros aminoácidos al caracterizar los sistemas de transporte N-I y N-II (véanse los apartados 3.1.1 y 3.1.3). Cabe indicar que las diferencias que se observan en las actividades de transporte entre los mutantes CSR8a y CSR8b, ambos afectados en el gen *nath*, podrían deberse a la polaridad sobre el gen *bgtA* en la estirpe CSR8a. Estos resultados confirmaban que el grupo de aminoácidos hidrofóbicos se transporta casi en exclusiva por el sistema de transporte N-I, mientras que no permitían obtener conclusiones sobre el transporte del grupo de aminoácidos polares.

El transporte de los aminoácidos de la nueva serie también se ensayó en los mutantes dobles CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10, afectados en los sistemas N-I y N-II en los dos primeros casos y en los sistemas N-I, N-II y Bgt en el último caso (Tabla 3.11; Figura 3.31).

Tabla 3.11. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe PCC 7120 y los mutantes dobles CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se indica en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de los mutantes CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 10 μM. Las actividades de transporte se indican, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media calculada a partir del número de ensayos independientes que se indica entre paréntesis. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis el nombre de los genes inactivados.

Aminoácido	Actividad de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·[10 min] ⁻¹)			
	PCC 7120	CSS6-R17 (<i>natB natF</i>)	CSX60-R8b (<i>natA nath</i>)	CSX60-R10 (<i>natA bgtA</i>)
Neutros polares				
L-Asn	87,9 ± 1,97 (3)	0,77 ± 0,03 (3)	0,44 ± 0,07 (3)	0,46 ± 0,05 (3)
L-Thr	88,9 ± 2,34 (3)	5,47 ± 0,70 (3)	2,68 ± 0,34 (3)	4,62 ± 0,58 (3)
Hidrofóbicos				
L-Met	83,4 ± 1,67 (3)	1,08 ± 0,07 (3)	0,95 ± 0,08 (3)	0,98 ± 0,09 (3)
L-Val	74,2 ± 0,86 (3)	0,58 ± 0,05 (3)	0,73 ± 0,04 (3)	0,77 ± 0,07 (3)
L-Ile	63,6 ± 0,83 (3)	0,59 ± 0,02 (3)	0,60 ± 0,05 (3)	0,60 ± 0,05 (3)
Aromáticos				
L-Tyr	68,5 (1)	1,67 (1)	1,40 (1)	1,35 (1)

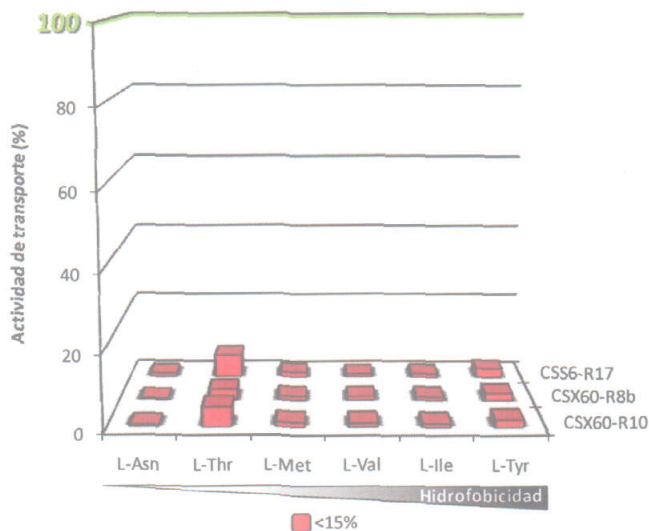


Figura 3.31. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes dobles CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10. Las actividades de transporte de los mutantes se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores indicada.

Las actividades de transporte estaban afectadas en todos los casos, si bien para el aminoácido Thr quedaba un transporte remanente en las tres estirpes ensayadas que podría ser mediado por algún otro transportador (Figura 3.31). Sobre la actividad de transporte de Thr se profundizará en el apartado 3.6 de *Resultados*. La comparación de los resultados recogidos en las Tablas 3.10 y 3.11 permite concluir que, como se había observado para otros aminoácidos polares, el transporte de los mismos y de la Met es mediado por los sistemas N-I y N-II, si bien en ausencia del sistema N-II la permeasa N-I es suficiente para mantener las actividades de transporte de la estirpe silvestre.

3.2.5. Transporte de aminoácidos en filamentos fragmentados.

En las bacterias con envuelta tipo Gram-negativo, como las cianobacterias, la membrana externa es la primera barrera de protección e impermeabilidad frente al medio externo. Por otra parte, como se ha descrito en el apartado 1.3, en *Anabaena* sp. PCC 7120 la membrana externa es continua a lo largo del filamento (Flores *et al.*, 2006). Una particularidad de la preparación de muestras para microscopía electrónica es que produce la fragmentación de los filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120. La inspección de micrografías electrónicas de filamentos fragmentados de esta forma muestra que el punto de ruptura en un filamento presenta agujeros a través de los cuales el espacio periplásmico podría estar en contacto directo con el medio en el que se encuentran suspendidos los filamentos (Figura 3.32). Para tratar de evaluar el efecto de la barrera selectiva que podría constituir la membrana externa, se estudió el transporte de aminoácidos en filamentos fragmentados mecánicamente.

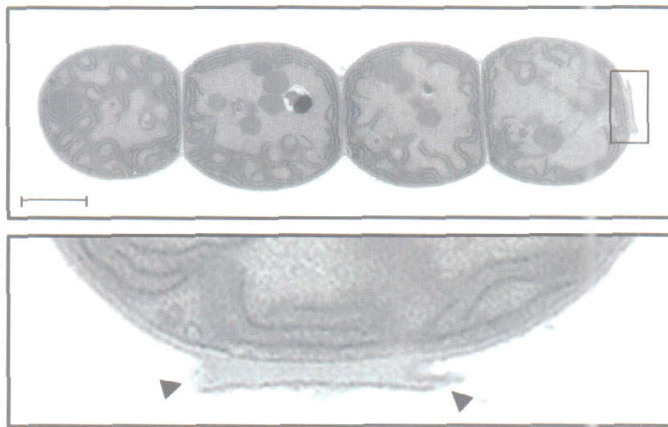


Figura 3.32. Filamento fragmentado de *Anabaena* sp. PCC 7120. Imagen de un filamento de *Anabaena* sp. PCC 7120 fragmentado en un extremo por efecto de la preparación de muestras para microscopía electrónica. En la imagen inferior se muestran con flechas los puntos por donde el espacio periplásmico puede entrar en contacto con el medio externo. Barra de escala, 1 µm. Imagen cortesía de I. Maldener.

Para fragmentar los filamentos, éstos, procedentes de cultivos con nitrato como fuente de nitrógeno, se sometieron a cuatro pasos a través de una jeringa, dando lugar a suspensiones que tenían filamentos con una longitud media de aproximadamente 10-15 células. Estos filamentos fragmentados se utilizaron en ensayos de transporte con los aminoácidos Glu, Gln, Asp y Arg marcados con ^{14}C , que se añadieron a baja concentración para asegurar que la actividad de transporte observada se debía a sistemas de transporte activo (Figura 3.33). Se detectaron actividades de transporte de Glu, Gln y Asp superiores a la que mostraban los filamentos no fragmentados utilizados de control (Figura 3.33A, B y C), que eran de más de 80 células en general. Sin embargo, en el caso de la Arg no se observaron diferencias significativas (Figura 3.33D).

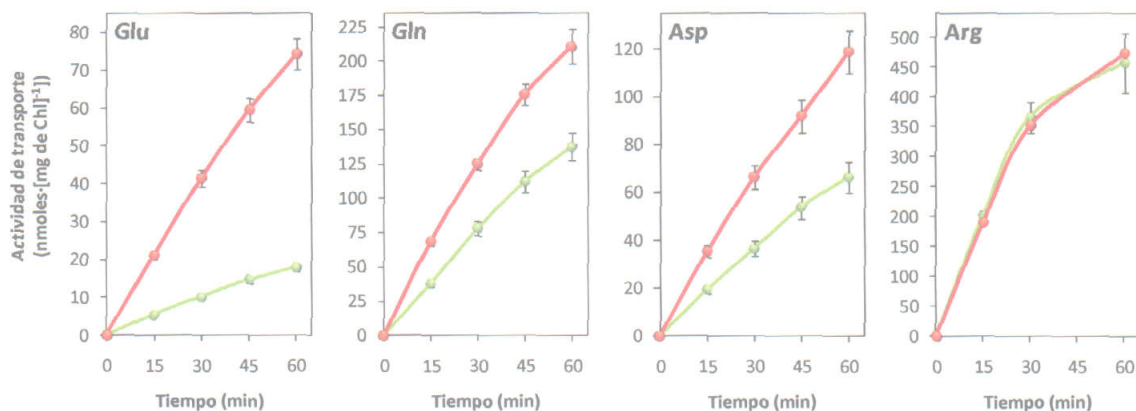


Figura 3.33. Efecto de la fragmentación de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la actividad de transporte de los aminoácidos Glu, Gln, Asp y Arg. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre cultivada en medio BG11 se incubaron durante 60 min con [¹⁴C]Glu, [¹⁴C]Gln, [¹⁴C]Asp y [¹⁴C]Arg, suministrados a concentración 3 μ M, tomándose muestras a los tiempos indicados. Para los ensayos con Glu se realizaron 6 determinaciones independientes, para los de Asp y Gln, 4 y para los de Arg, 2. En verde se indica la actividad de los filamentos sin fragmentar y en rojo la de los fragmentados.

El aumento de la actividad de transporte de Glu al fragmentar los filamentos era de 4 veces con respecto a los filamentos no fragmentados, mientras que para Gln y Asp era de 1,5 y 1,7 veces, respectivamente. Se decidió analizar la actividad de transporte de otros aminoácidos en filamentos fragmentados (Tabla 3.12). Los resultados obtenidos indicaban que en filamentos fragmentados también se producía un incremento de la actividad de transporte de His, Leu y Phe, siendo éste entre 1,4 y 1,7 veces, aproximadamente, mientras que para el resto de los aminoácidos ensayados no se observaban diferencias significativas. Para determinar si el efecto de la fragmentación también se observaba con metabolitos que no fueran aminoácidos, se ensayaron las actividades de transporte de [¹⁴C]urea y [¹⁴C]metilamina en filamentos fragmentados y sin fragmentar. Sin embargo, en este caso no se observaron diferencias apreciables entre filamentos fragmentados y sin fragmentar (Tabla 3.12). Estos resultados sugieren que en *Anabaena* sp. PCC 7120 la membrana externa actúa como una barrera de permeabilidad selectivamente para algunos aminoácidos como el Glu.

Tabla 3.12. Actividades de transporte de aminoácidos en filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 sin fragmentar y fragmentados mecánicamente. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se indica en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre cultivada en medio BG11 se incubaron durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 3 μ M, con 3 μ M de urea o con 1 μ M de metilamina. La actividad de transporte se presenta, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·min⁻¹, como la media \pm la desviación estándar de la media del número de ensayos que se indica entre paréntesis. Se muestra la relación de las actividades de transporte de los filamentos fragmentados con respecto a los filamentos sin fragmentar.

Sustrato	Actividad de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·min ⁻¹)		
	Sin fragmentar	Fragmentado	Ratio
Urea	0,218 (1)	0,222 (1)	1,02
Metilamina	1,471 (1)	1,337 (1)	0,91
Aminoácidos			
L-Arg	9,83 \pm 1,62 (4)	10,0 \pm 1,19 (4)	1,02
L-Lys	13,2 \pm 2,09 (2)	13,3 \pm 1,66 (2)	1,01
L-His	3,65 \pm 0,41 (2)	5,47 \pm 0,32 (2)	1,50
L-Asp	1,23 \pm 0,13 (5)	2,14 \pm 0,19 (5)	1,74
L-Glu	0,33 \pm 0,02 (7)	1,32 \pm 0,06 (7)	3,95
L-Gln	2,78 \pm 0,52 (5)	4,34 \pm 0,77 (5)	1,56
L-Ser	11,8 \pm 3,00 (2)	12,1 \pm 3,29 (2)	1,03
Gly	14,7 \pm 1,61 (2)	14,7 \pm 1,62 (2)	1,00
L-Ala	11,4 \pm 2,92 (2)	11,9 \pm 2,33 (2)	1,04
L-Leu	4,61 \pm 1,40 (2)	7,62 \pm 1,96 (2)	1,65
L-Phe	4,92 \pm 1,30 (2)	6,75 \pm 1,59 (2)	1,37
L-Pro	6,11 \pm 1,23 (2)	7,00 \pm 1,82 (2)	1,15

La K_s para el transporte de Glu se determinó en filamentos fragmentados y, como comparación, en filamentos completos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Figura 3.34A). De acuerdo con datos publicados previamente (Flores y Muro-Pastor, 1988), en los filamentos completos se observaba un único componente cinético, con un valor de K_s de aproximadamente 189 μM (Figura 3.34B). Por el contrario, los filamentos fragmentados mostraban dos componentes cinéticos con valores de K_s en torno a 8,1 y 137 μM , respectivamente (Figura 3.34B).

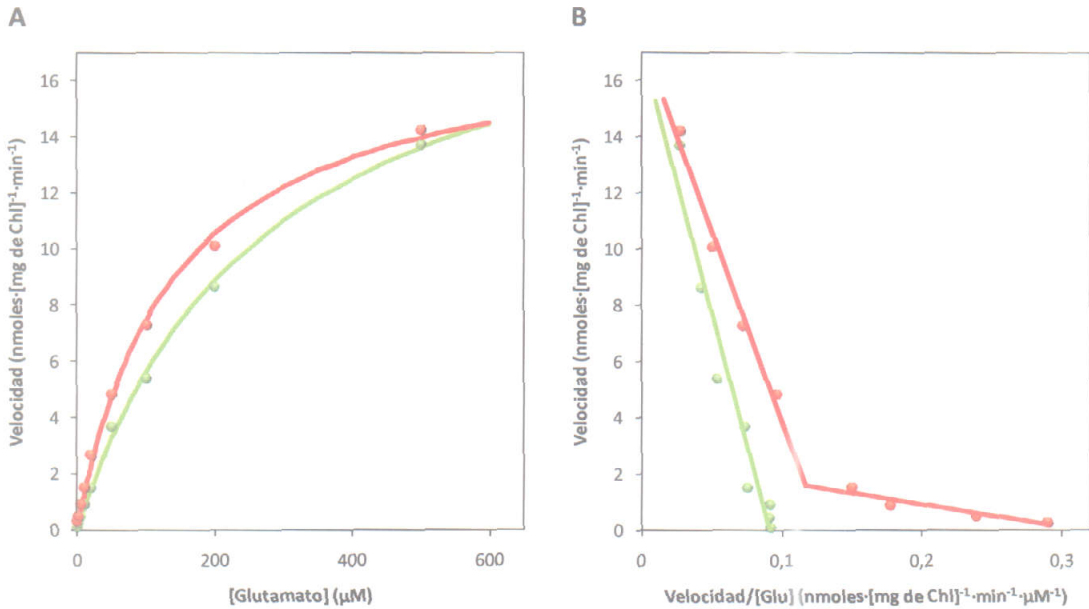


Figura 3.34. Efecto de la fragmentación de filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la cinética de transporte de Glu. A, representación de Michaelis-Menten de la cinética de transporte de Glu. B, representación de Eadie-Hoffstee que muestra los componentes cinéticos implicados en el transporte. En ambos paneles, en verde se muestran las cinéticas de los filamentos sin fragmentar y en rojo las de los filamentos fragmentados.

Dado que el Glu puede ser incorporado en *Anabaena* sp. PCC 7120 a través de los sistemas N-I y N-II (véanse los apartados 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3), la actividad de transporte de este aminoácido también se estudió en filamentos fragmentados de mutantes afectados en estas permeasas. Para ello, los mutantes CSX60, afectado en el sistema N-I, CSR8b, afectado en el sistema N-II, CSR10, afectado en los sistemas N-II y Bgt, y CSX60-R8b, afectado en los sistemas N-I y N-II, se sometieron a ensayos de transporte de Glu suministrado a concentraciones 1 y 10 μM (Figura 3.35). La fragmentación de los filamentos producía un aumento del transporte de Glu en la estirpe mutante del sistema N-I CSX60 que era similar al observado en la estirpe silvestre. Sin embargo, el efecto causado por la fragmentación de los filamentos no se observaba en los mutantes del sistema N-II CSR8b (Figura 3.35) y CSR10 (datos no mostrados). Por otra parte, la estirpe CSX60-R8b mostraba, como se esperaba, una actividad muy baja de transporte de Glu, que no se afectaba significativamente por la fragmentación. Estos resultados indican que la fragmentación de los filamentos desenmascara un componente cinético de alta afinidad de transporte de Glu y que este componente corresponde al transporte mediado por el sistema N-II.

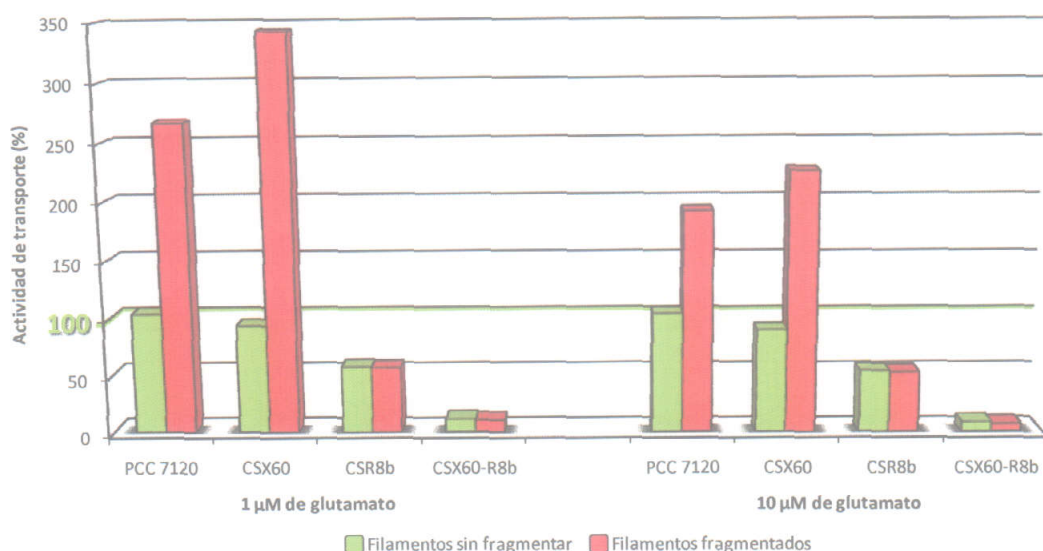


Figura 3.35. Efecto de la fragmentación de filamentos de las estirpes PCC 7120, CSX60, CSR8b y CSX60-R8b en la actividad de transporte de Glu. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y de los mutantes CSX60, CSR8b y CSX60-R8b cultivados en medio BG11 se incubaron durante 10 min con [14 C]Glu, suministrado a 1 μ M y a 10 μ M de concentración. Para cada una de las concentraciones ensayadas se toma como 100% la actividad de transporte de los filamentos no fragmentados de la estirpe silvestre.

3.3. Expresión espacial de los sistemas de transporte de aminoácidos.

En un trabajo anterior de este grupo de investigación se había concluido que los genes que determinan las proteínas del sistema de transporte N-I se reprimen en los heterocistos, expresándose en condiciones diazotróficas únicamente en las células vegetativas (Picossi, 2003). Estos estudios se llevaron a cabo mediante análisis de expresión de mRNA de algunos de los genes *nat* del sistema N-I. En este trabajo, con objeto de estudiar la distribución espacial de los transportadores Bgt y N-II en los filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120, se investigó la expresión de los mismos mediante fusiones con la proteína GFP y ensayos de transporte de aminoácidos con heterocistos aislados.

3.3.1. Expresión de proteínas fusionadas a la proteína GFP.

Para investigar la localización celular y subcelular de los sistemas de transporte Bgt y N-II, se realizó un estudio de la expresión de los mismos utilizando el gen testigo *gfp* (que determina la proteína GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) fusionado al extremo 3' del gen *bgtA*, manteniendo la pauta de lectura abierta entre ambos genes. Como material de partida, se utilizó el plásmido pCSEL21 (véase el apartado 2.8.1 de *Materiales y Métodos*), que contiene el gen *gfp* fusionado a otro gen.

La construcción se llevó a cabo amplificando mediante PCR un fragmento de DNA que contenía el gen *bgtA* completo, utilizando para ello DNA cromosómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y los oligonucleótidos alr4167-7120-ClaI (que introduce una diana *Cla* I) y alr4167-7120-GFP (que introduce una diana *EcoR* V), que aparean con secuencias adyacentes a la propia ORF (Figura 3.36; véase la Tabla 2.5). El producto resultante de la reacción, de 792 pb, se clonó en el vector pMBL-T, generándose el plásmido pCSR70. La secuencia del fragmento clonado del gen *bgtA* se analizó tal como se describe en el apartado 2.8.8. Comprobada la integridad de la secuencia, el plásmido se digirió con *Cla* I y *EcoR* V, y el fragmento resultante se ligó con el plásmido pCSEL21, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido pCSR73. En este paso, el promotor de *ntcA* se sustituyó por la copia completa del gen *bgtA* de *Anabaena* sp. PCC 7120, provocando una fusión traduccional del gen *gfp* y el extremo 3'

de *bgtA* manteniendo la pauta de lectura abierta entre ambos. Por último, el plásmido pCSR73 se digirió con *EcoR* I, y el fragmento de DNA que contenía el producto de la fusión de ambos genes se insertó entre los sitios *EcoR* I presentes en el vector pCSV3, generándose el plásmido pCSR79 (Figura 3.36).

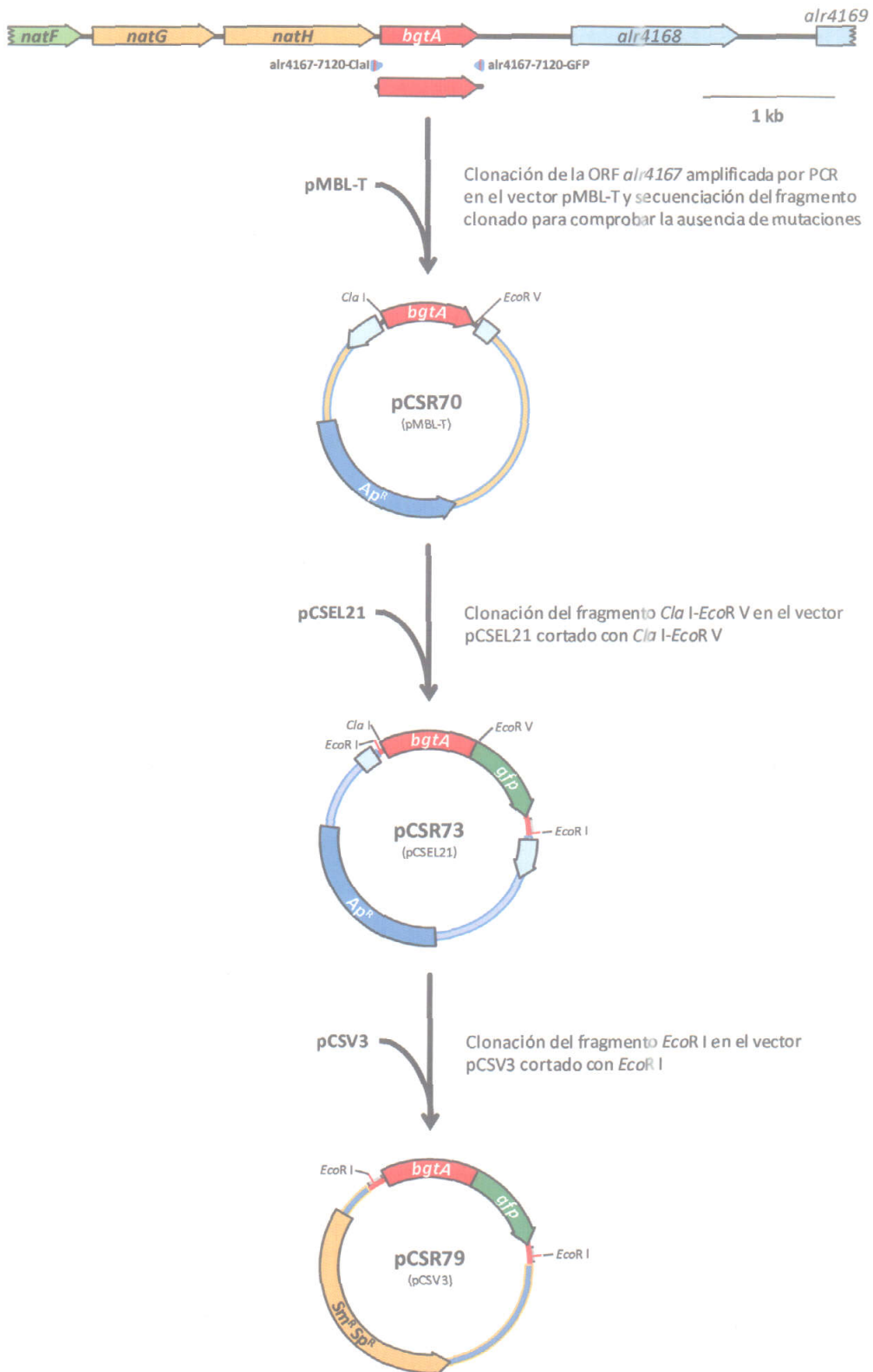


Figura 3.36. Esquema de la construcción de un plásmido que contiene el gen *bgtA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 fusionado traduccionalmente con el gen testigo *gfp*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con una región en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *Cla* I o *EcoR* V) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

El plásmido pCSR79 se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación con el fin de generar una estirpe derivada en la que se produjera una proteína resultado de la fusión de BgtA y GFP, portando la proteína GFP en el extremo carboxilo de BgtA (BgtA-C-GFP; Figura 3.37), seleccionándose clones resistentes a Sm y Sp, que habrían incorporado la construcción transferida por recombinación simple. Los clones seleccionados se analizaron mediante PCR para comprobar que el plásmido transferido se había integrado correctamente en el genoma, empleando para ello DNA total de cada uno de los clones seleccionados y las parejas de oligonucleótidos *alr4167-7120-7*/*GFP-4*, para detectar la banda esperada de los genes *bgtA* y *gfp* fusionados, que presentaría un tamaño de 962 pb, y *alr4167-7120-7*/*alr4167-7120-8*, para detectar la posible existencia de la banda silvestre, que tendría un tamaño de 974 pb, en los clones mutantes (Figura 3.37; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). Una vez comprobada la integración en el genoma de varios de los clones seleccionados, se eligió uno y se denominó estirpe CSR21b. Esta estirpe porta dos copias del gen *bgtA* (*alr4167*), una fusionada al gen *gfp* y otra silvestre (Figura 3.37).

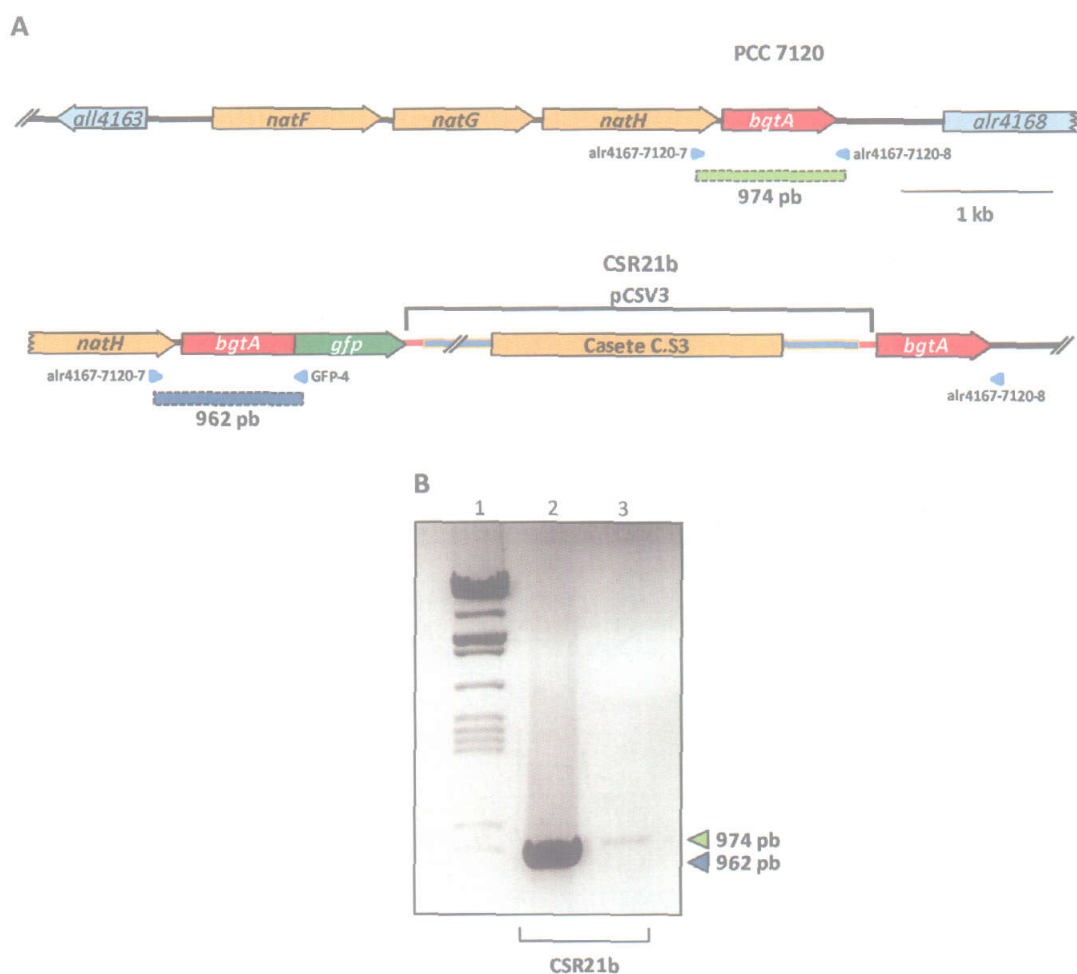


Figura 3.37. Estructura cromosómica de la estirpe mutante CSR21b en la región del agrupamiento génico *natFGH-bgtA*. A, representación esquemática de la región genómica que contiene el gen *bgtA* de la estirpe silvestre y del mutante CSR21b. Se indican los oligonucleótidos empleados para analizar la segregación mediante PCR, los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y mutante CSR21b, el sitio de la fusión de *bgtA* con el gen *gfp* y la parte del plásmido integrado correspondiente al vector pCSV3. B, resultado del análisis de PCR para determinar la estructura genómica de la estirpe CSR21b. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en la 2, el resultado de la amplificación por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos *alr4167-7120-7* y *GFP-4* para comprobar que los genes *bgtA* y *gfp* están fusionados en la estirpe mutante (triángulo azul), y en la 3 el correspondiente a los oligonucleótidos *alr4167-7120-7*/*alr4167-7120-8* para detectar la presencia del gen *bgtA* silvestre en la estirpe mutante (triángulo verde). Se indica el tamaño de las bandas detectadas.

Cuando se estudió la distribución de la fluorescencia, se observó que en filamentos incubados con nitrato ésta se localizaba en todas las células, con una señal algo más elevada en la periferia que en el centro de las mismas, y en especial en los septos intercelulares (Figura 3.38A). Sin embargo, la cuantificación de la señal de fluorescencia paralela y transversalmente al eje longitudinal de los filamentos indicaba que ésta no era más de dos veces superior en los septos que en las regiones periféricas de las células, lo que sugería que el incremento de señal en los septos se debía a la yuxtaposición de la señal de dos células adyacentes. Por otra parte, en filamentos incubados en ausencia de nitrógeno combinado, la fluorescencia también se observaba en todas las células del filamento, tanto células vegetativas como heterocistos, y a niveles superiores en la periferia de las células (Figura 3.38B). Estos resultados sugieren una asociación de la proteína BgtA-C-GFP con la membrana citoplasmática, donde BgtA interactuaría con los dominios citoplasmáticos de las proteínas transmembrana de los sistemas de transporte Bgt y/o N-II.

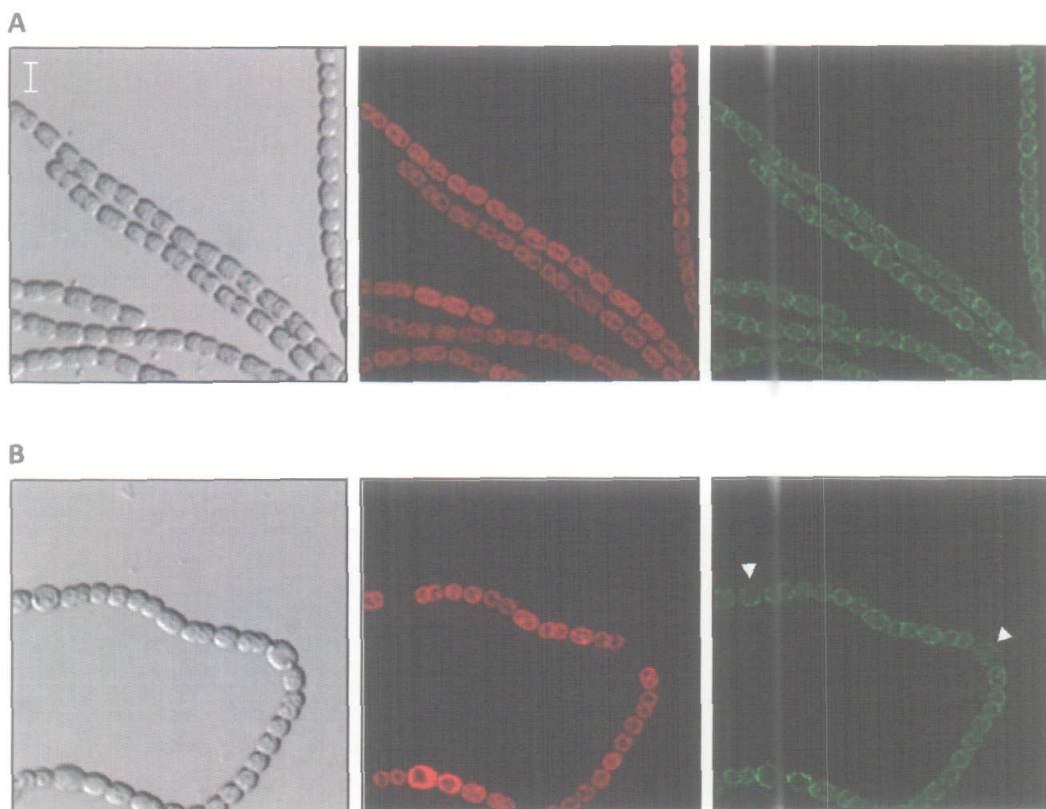


Figura 3.38. Localización de la proteína BgtA-C-GFP en la estirpe CSR21b. Imágenes de luz transmitida (izquierda), autofluorescencia de la cianobacteria (centro) y fluorescencia de la proteína GFP (derecha). Filamentos de la estirpe CSR21b cultivados con nitrato se lavaron con medio BG11₀, se homogeneizaron y se utilizaron para inocular medios BG11 y BG11₀, incubándose durante 72h los primeros (A) y durante 48h los segundos (B). Los heterocistos muestran una autofluorescencia reducida o ausente con respecto a las células vegetativas. Con flechas blancas se señalan los heterocistos presentes en el filamento. Barra de escala, 5 μ m.

Para estudiar con qué complejo de membrana puede interactuar BgtA-C-GFP, el plásmido pCSR79 portador del gen *bgtA-gfp* se transfirió mediante conjugación a las estirpes CSS8 (*bgtB::C.K3*) y CSR8b (*nath::pRL424*), seleccionándose clones resistentes a Sm y Sp que se analizaron mediante PCR como se describió para la estirpe CSR21b (Figura 3.39). De cada conjugación se seleccionó un clon con el plásmido integrado correctamente en el genoma, que se denominaron estirpe CSR22b, al derivado del mutante CSS8, y CSR23b, al generado a partir del mutante CSR8b. En filamentos incubados con nitrato de las dos estirpes generadas la fluorescencia de la proteína GFP se observaba en la periferia de las células (Figura 3.40A y C). En ausencia de nitrógeno combinado, ambas estirpes desarrollaban hetero-

cistos, y la fluorescencia de la proteína GFP se observaba tanto en las células vegetativas como en los heterocistos (Figura 3.40B y D). Estos resultados sugieren que la proteína BgtA-C-GFP se puede asociar con las membranas citoplasmáticas interaccionando con los complejos de membrana tanto del sistema N-II (dado que la estirpe CSR22b carece de la proteína BgtB) como del sistema Bgt (puesto que la estirpe CSR23b carece de NatH), y que los dos transportadores están presentes en las células vegetativas y en los heterocistos.

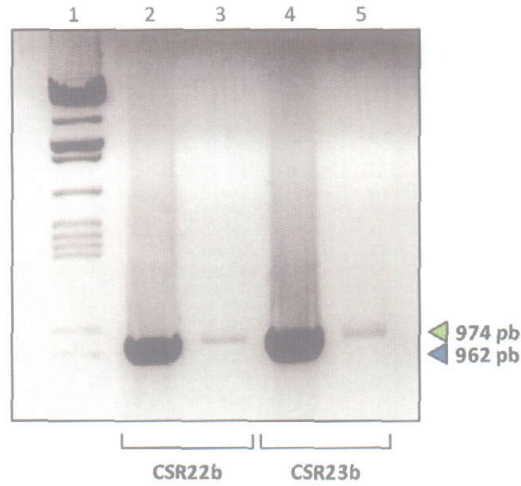


Figura 3.39. Estructura cromosómica de las estirpes mutantes CSR22b y CSR23b en la región del agrupamiento génico *natFGH-bgtA*. Resultado del análisis de PCR de las estirpes CSR22b y CSR23b. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 4, el resultado de la amplificación por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos alr4167-7120-7/GFP-4 para comprobar que los genes *bgtA* y *gfp* están fusionados en las estirpes mutantes CSR22b y CSR23b, respectivamente (triángulo azul), y en las 3 y 5 el correspondiente a los oligonucleótidos alr4167-7120-7/alr4167-7120-8 para detectar la presencia del gen *bgtA* silvestre en las estirpes mutantes CSR22b y CSR23b, respectivamente (triángulo verde). Se indica el tamaño de las bandas detectadas, que son aquéllas mostradas en la Figura 3.37A.

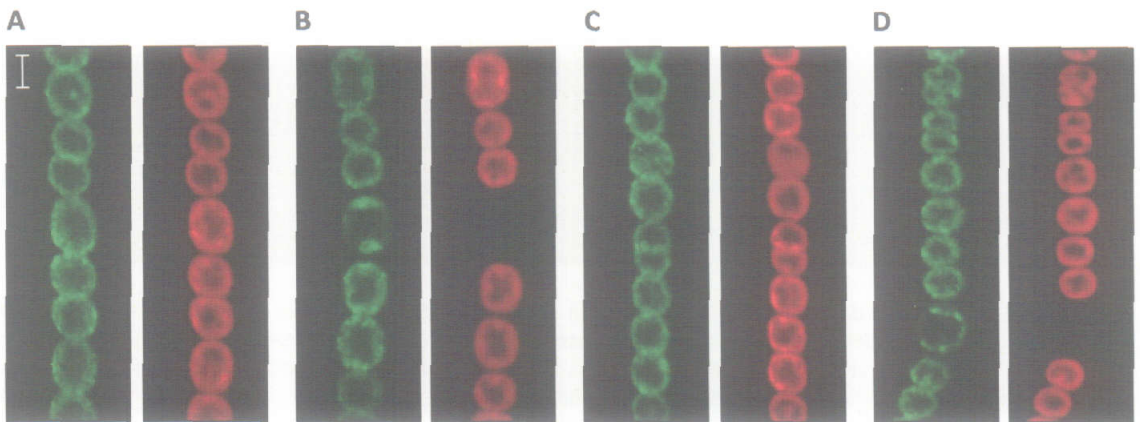


Figura 3.40. Localización de la proteína BgtA-C-GFP en las estirpes CSR22b y CSR23b. La fluorescencia de la proteína GFP se muestra en verde y la autofluorescencia cianobacteriana en rojo en las estirpes CSR22b (derivada de CSS8; A y B) y CSR23b (derivada de CSR8b; C y D) portando la proteína BgtA-C-GFP. Los filamentos se tomaron de cultivos en medio BG11, se lavaron con medio BG11₀, se homogeneizaron y se utilizaron para inocular medios BG11 y BG11₀, incubándose durante 72h los primeros (A y C) y durante 48h los segundos (B y D). Los heterocistos muestran una autofluorescencia reducida o ausente con respecto a las células vegetativas. Barra de escala, 2 μm.

3.3.2. Actividad de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados.

La presencia de los sistemas de transporte Bgt y N-II tanto en las células vegetativas como en los heterocistos, a diferencia del sistema N-I que se expresa exclusivamente en las células vegetativas

(Picossi, 2003), centró nuestro interés en estudiar las actividades de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados. Éstos se obtenían tras la ruptura de filamentos incubados en ausencia de nitrógeno combinado durante 18 h. Para asegurar la especificidad de los ensayos de transporte, realizados con ocho [^{14}C]aminoácidos representativos, éstos se llevaron a cabo utilizando una concentración de sustrato muy baja, 1 μM (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Actividades de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de los mutantes CSS8, CSR10 y CSR8b. Filamentos enteros cultivados con gaseo de aire:CO₂ (99:1) en medio BG11₀C durante 18 h o heterocistos aislados de filamentos incubados en las mismas condiciones se sometieron a ensayos de transporte durante 10 min con los [^{14}C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 1 μM (véase el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*). Los resultados se muestran, como la media \pm la desviación estándar de la media del número de ensayos que se indica entre paréntesis, en nmoles \cdot (mg de proteína) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$. Como referencia se emplea la proteína de las muestras en lugar de la Chl debido a que el contenido de ésta es diferente en las células vegetativas y los heterocistos. Para cada estirpe mutante se indica entre paréntesis el nombre del gen inactivado.

Aminoácido	Actividad de transporte de aminoácidos (nmoles \cdot (mg proteína) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$)				
	Filamentos		Heterocistos		
	PCC 7120	PCC 7120	CSS8 (<i>bgtB</i>)	CSR10 (<i>bgtA</i>)	CSR8b (<i>nathH</i>)
Básicos					
L-Arg	5,73 \pm 0,91 (4)	1,59 \pm 0,23 (3)	0,01 \pm 0,002 (4)	0,003 \pm 0,002 (3)	1,45 \pm 0,13 (3)
L-Lys	4,63 \pm 0,58 (4)	1,70 \pm 0,13 (5)	0,01 \pm 0,001 (6)	0,01 \pm 0,002 (5)	1,49 \pm 0,10 (5)
Ácidos					
L-Asp	0,48 \pm 0,06 (4)	0,92 \pm 0,03 (6)	0,49 \pm 0,04 (6)	0,03 \pm 0,004 (6)	0,03 \pm 0,003 (6)
L-Glu	0,27 \pm 0,02 (4)	0,78 \pm 0,04 (6)	0,40 \pm 0,03 (6)	0,01 \pm 0,001 (6)	0,02 \pm 0,001 (6)
Neutros polares					
L-Gln	1,65 \pm 0,11 (4)	0,83 \pm 0,07 (5)	0,47 \pm 0,05 (6)	0,09 \pm 0,01 (6)	0,10 \pm 0,01 (6)
Hidrofóbicos					
L-Ala	3,02 \pm 0,11 (4)	0,74 \pm 0,02 (5)	0,45 \pm 0,04 (6)	0,94 \pm 0,05 (6)	0,98 \pm 0,08 (6)
Aromáticas					
L-Phe	1,11 \pm 0,07 (4)	0,30 \pm 0,02 (6)	0,18 \pm 0,02 (6)	0,33 \pm 0,02 (6)	0,39 \pm 0,03 (6)
Únicos					
L-Pro	1,96 \pm 0,24 (4)	0,09 \pm 0,01 (5)	0,02 \pm 0,002 (6)	0,05 \pm 0,004 (5)	0,05 \pm 0,001 (6)

De acuerdo con la ausencia de expresión de los genes *natCA* y *natB* del sistema de transporte de aminoácidos neutros N-II en los heterocistos (Picossi, 2003), los heterocistos aislados de la estirpe silvestre PCC 7120 mostraban una actividad muy baja de transporte de Pro (Tabla 3.13), aminoácido que es el sustrato característico de este transportador. El transporte residual de Pro podría ser debido a la presencia de algunas células vegetativas en las preparaciones. Sin embargo, comparados con los filamentos enteros incubados en ausencia de nitrógeno combinado, los heterocistos aislados de la estirpe silvestre PCC 7120 mostraban actividades de transporte apreciables de los aminoácidos básicos Arg y Lys y de los aminoácidos neutros Ala, Gln y Phe. Cabe destacar que la actividad de transporte de los heterocistos aislados está, en general, afectada, posiblemente debido al procedimiento de rotura que se emplea para la obtención de los mismos a partir de filamentos completos. Esto puede dar lugar a la existencia de heterocistos no funcionales o defectuosos, motivo por el que las actividades de transporte de aminoácidos serían inferiores a las de los filamentos. Por otra parte, los heterocistos aislados de las estirpes mutantes CSS8 (*bgtB*) y CSR10 (*bgtA*) no transportaban aminoácidos básicos, lo cual indicaba que en los heterocistos el transporte de estos aminoácidos es mediado por el sistema de transporte Bgt. Asimismo, los heterocistos aislados de las estirpes mutantes CSR10 (*bgtA*) y CSR8b (*nathH*) mostraban una actividad de transporte de Gln muy baja, que indicaba que este transporte es mediado por el sistema N-II. Sin embargo, el transporte de Ala y Phe era considerable en los heterocistos aislados de los mutantes *bgtA* y *nathH*, lo que sugiere que los heterocistos poseen otro transportador para estos aminoácidos hidrofóbicos.

Las actividades de transporte de los aminoácidos ácidos Asp y Glu eran 2 y 3 veces más elevadas, respectivamente, en los heterocistos aislados que en los filamentos enteros de la estirpe silvestre. Estas actividades de transporte eran mediadas por el sistema de transporte N-II, puesto que no se observaban en los mutantes CSR10 y CSR8b. El aumento de la actividad de transporte de aminoácidos ácidos que se observaba en los heterocistos aislados de la estirpe silvestre podría estar relacionado con el incremento del transporte que tiene lugar en filamentos fragmentados mecánicamente que se describió en el apartado 3.2.5.

Estos resultados confirmaban la presencia de los sistemas de transporte Bgt y N-II en los heterocistos, células que podrían presentar además un transportador de aminoácidos hidrofóbicos diferente. Por último, debe indicarse que los heterocistos aislados de la estirpe mutante CSS8 mostraban, en general, una actividad de transporte de aminoácidos relativamente baja con respecto al resto de las estirpes, desconociéndose la causa de esta alteración.

3.4. Fenotipo de crecimiento y liberación de aminoácidos de los mutantes de los transportadores.

Algunos mutantes espontáneos de sistemas de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120 están alterados en su capacidad de crecer diazotróficamente y pierden aminoácidos que se acumulan en el medio externo (Montesinos *et al.*, 1995). Estos aspectos se estudiaron también en los mutantes de transportadores generados en este trabajo.

3.4.1. Crecimiento de los mutantes de sistemas de transporte de aminoácidos.

El crecimiento de los mutantes generados en este trabajo se estudió en medios sólidos y líquidos en ausencia de nitrógeno combinado y en presencia de nitrato. Con respecto al sistema de transporte N-I, se estudiaron en medio sólido las estirpes CSR11 (*natD*) y CSR5 (*natE*), incluyéndose también la estirpe silvestre y los mutantes CSX60 (*nata*), CSX62 (*natC*), CSS6 (*natB*) y CSR4 (*gluR0*) a efectos comparativos (Figura 3.41).

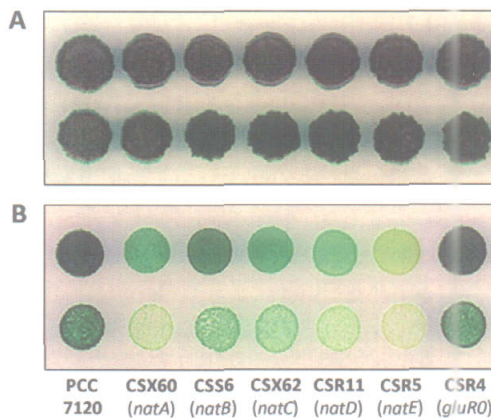


Figura 3.41. Crecimiento de los mutantes *nat* y CSR4 en medio sólido. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre (PCC 7120) y de los mutantes CSX60 (*nata*::C.S3), CSX62 (*natC*::C.S3), CSS6 (*natB*::C.S3), CSR11 (*natD*::pCSV3), CSR5 (*natE*::pRL424) y CSR4 (*gluR0*::pRL424) cultivados en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de las estirpes mutantes) se lavaron y homogeneizaron y se utilizaron para inocular cajas de medio sólido BG11 (A) y BG11₀ (B) con gotas de 7 μ l de suspensión celular conteniendo 70 ng de Chl (línea superior) o 7 ng de Chl (línea inferior), que se incubaron durante 10 días en condiciones de cultivo.

En medio sólido BG11 no se apreciaba ninguna diferencia entre la estirpe silvestre y los mutantes *nat* (Figura 3.41A), mientras que en medio BG11₀ (sin nitrógeno combinado) el crecimiento estaba afectado

en todos los mutantes del sistema N-I (Figura 3.41B). Sin embargo, aunque el crecimiento de la estirpe mutante CSS6 también estaba mermado en el medio BG11_o, la deficiencia que mostraba era menor que la del resto de los mutantes (véase también Tabla 3.14 y Picossi, 2003). Por último, la estirpe CSR4 presentaba un fenotipo de crecimiento silvestre tanto en medios con nitrato como en aquéllos carentes de nitrógeno combinado (Figura 3.41), lo cual es consistente con que All2911 no forme parte del sistema de transporte N-I.

Los mutantes *natB* y *natA* se estudiaron en medio líquido, no detectándose diferencias en medios con nitrato (Tabla 3.14). Sin embargo, en ausencia de nitrógeno combinado dichos mutantes presentaban tasas de crecimiento de un 67% y un 45%, respectivamente, con respecto a la de la estirpe silvestre. La diferencia entre ambos mutantes apunta de nuevo a la existencia de, al menos, otra proteína de unión de sustrato diferente de NatB que también pudiera formar parte del sistema N-I, como ya se indicó en el apartado 3.1.1.3.

Con respecto al sistema de transporte Bgt, se estudió el crecimiento de las estirpes CSS8 (*bgtB*) y CSR10 (*bgtA*), tanto en medio sólido como líquido, aunque en medio sólido no se encontraron diferencias con respecto a la estirpe silvestre, ni en presencia de nitrato ni en condiciones diazotróficas (datos no mostrados). Tampoco se encontraron diferencias en medio líquido con nitrato (Tabla 3.14). Sin embargo, en medio líquido en ausencia de nitrógeno combinado, la constante de crecimiento de la estirpe afectada en *bgtA* era un 18% inferior a la de la estirpe silvestre, mientras que el crecimiento del mutante *bgtB* era sólo un 6% inferior al de la estirpe silvestre. La diferencia en el crecimiento diazotrófico entre las dos estirpes podría deberse a que en el mutante *bgtA* están afectados los sistemas de transporte Bgt y N-II, mientras que en el mutante *bgtB* sólo está inactivado el sistema Bgt.

Tabla 3.14. Crecimiento en medio líquido de los mutantes de sistemas de transporte de aminoácidos. Células de las estirpes PCC 7120, CSS6, CSX60, CSS8, CSR17, CSR8a, CSR8b, CSR10, CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se lavaron con medio BG11_o, se homogeneizaron y se inocularon en medios BG11 y BG11_o sin antibióticos, a razón de 0,2 µg Chl·mL⁻², incubándose en condiciones de cultivo durante 5-10 días para la determinación de las constantes de crecimiento, µ, como se describe en el apartado 2.1.1.3 de *Materiales y Métodos*. En las condiciones de cultivo empleadas, el crecimiento era exponencial durante 80-100 h. Los resultados que se muestran son la media ± la desviación estándar de la media, en días⁻¹, de los datos obtenidos en el número de experimentos que se indica entre paréntesis.

Estirpe	Genotipo	Constante de crecimiento (µ, días ⁻¹)	
		BG11	BG11 _o
PCC 7120	Silvestre	0,66 ± 0,01 (10)	0,49 ± 0,01 (12)
<i>Sistema N-I</i>			
CSS6	<i>natB</i> ::C.S3	0,67 ± 0,03 (4)	0,33 ± 0,01 (6)
CSX60	<i>natA</i> ::C.S3	0,65 ± 0,03 (6)	0,22 ± 0,01 (5)
<i>Sistema Bgt</i>			
CSS8	<i>bgtB</i> ::C.K3	0,67 ± 0,02 (4)	0,46 ± 0,03 (5)
<i>Sistema N-II</i>			
CSR17	<i>natF</i> ::pRL424	0,68 ± 0,04 (4)	0,37 ± 0,01 (6)
CSR8b	<i>natH</i> ::pRL424	0,67 ± 0,02 (4)	0,48 ± 0,03 (5)
CSR8a	<i>natH</i> ::pCSV3	0,67 ± 0,01 (5)	0,43 ± 0,02 (4)
<i>Sistemas N-II y Bgt</i>			
CSR10	<i>bgtA</i> ::pCSV3	0,66 ± 0,03 (6)	0,40 ± 0,01 (7)
<i>Sistemas N-I y N-II</i>			
CSS6-R17	<i>natB</i> ::C.S3 <i>natF</i> ::pRL424	0,66 ± 0,04 (4)	0,26 ± 0,02 (6)
CSX60-R8b	<i>natA</i> ::C.S3 <i>natH</i> ::pRL424	0,66 ± 0,03 (6)	0,11 ± 0,01 (6)
<i>Sistemas N-I, N-II y Bgt</i>			
CSX60-R10	<i>natA</i> ::C.S3 <i>bgtA</i> ::pRL424	0,67 ± 0,03 (4)	0,10 ± 0,01 (4)

Con respecto a los mutantes del sistema N-II, éstos no estaban afectados en el crecimiento a expensas de nitrato y presentaban diferentes grados de deficiencia en el crecimiento diazotrófico según la subunidad del mismo inactivada (Tabla 3.14). Así, el mutante *natF*, afectado en la proteína periplásmica de unión de sustrato, presentaba una constante de crecimiento en condiciones diazotróficas un 24% inferior a la de la estirpe silvestre, mientras que en los mutantes *natH::pCSV3* y *bgtA* las diferencias eran menos acusadas, siendo un 12% y un 18% menores, respectivamente, que la tasa de crecimiento de la estirpe silvestre. Sin embargo, en estas condiciones, el mutante *natH::pRL424* no presentaba diferencias significativas con respecto a la estirpe silvestre. La diferencia de crecimiento entre los mutantes *natH::pCSV3* y *natH::pRL424*, afectados en el mismo gen, podría deberse a efectos polares parciales sobre el gen *bgtA* en el primer mutante, como se ha comentado en el apartado 3.1.3.2. Así pues, pese a que los mutantes *natF*, *natH::pCSV3* y *bgtA* presentaban deficiencias en el crecimiento diazotrófico, éstas eran menos drásticas que las presentadas por los mutantes *natB* y *natA* del sistema N-I.

En relación a los mutantes afectados en los transportadores N-I y N-II, mientras que el crecimiento a expensas de nitrato no estaba afectado, la constante de crecimiento en condiciones diazotróficas de los mutantes dobles *natB natF* y *natA natH* era inferior a la de sus estirpes parentales correspondientes (Tabla 3.14). Así, mientras que los mutantes *natB* y *natF* presentaban tasas de crecimiento diazotrófico un 33% y un 24% inferiores, respectivamente, a la estirpe PCC 7120, el mutante *natB natF* mostraba una tasa un 47% más baja que la de la estirpe silvestre (Tabla 3.14). Del mismo modo, el mutante doble *natA natH* presentaba una tasa de crecimiento un 78% inferior a la tasa de la estirpe silvestre, mientras que de sus estirpes parentales sólo CSX60 (*natA*) mostraba un defecto en el crecimiento en estas condiciones, siendo un 55% inferior respecto a la estirpe silvestre. Esta deficiencia más acusada en la estirpe *natA natH*, que tenía inactivados los genes de una subunidad ATPasa (*natA*) del sistema N-I y de una subunidad transmembrana (*natH*) del sistema N-II, que en la estirpe *natB natF*, en la que se habían inactivado los genes correspondientes a las proteínas periplásmicas de unión de sustrato de dichos sistemas de transporte, sugería otra vez que otras proteínas periplásmicas de unión de sustrato distintas a NatB y NatF podrían contribuir a la actividad de los transportadores N-I y N-II. Por último, el mutante *natA bgtA*, afectado en los tres sistemas de transporte descritos, presentaba una deficiencia notable en su tasa de crecimiento diazotrófico, siendo la tasa de crecimiento en estas condiciones un 80% inferior a la mostrada por la estirpe silvestre y un 9% inferior a la que presentaba el mutante *natA natH*. Sin embargo, su crecimiento con nitrato era similar al de la estirpe silvestre.

Así pues, en ninguno de los mutantes estudiados se encuentran diferencias con respecto a la estirpe silvestre en medios con nitrato, mientras que en condiciones diazotróficas se encuentran diferencias en la mayoría de los mutantes analizados, aunque el grado de deficiencia varía según los sistemas de transporte de aminoácidos inactivados. Estos resultados ponen de manifiesto un requerimiento específico de los sistemas de transporte N-I y N-II, pero no así del Bgt, para un crecimiento diazotrófico óptimo de *Anabaena* sp. PCC 7120.

3.4.2. Liberación de aminoácidos al medio extracelular.

En trabajos anteriores se había observado que algunos mutantes de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120, entre los que se incluye el mutante CSX60 (*natA*) del sistema de transporte N-I, presentaban una pérdida de aminoácidos hidrofóbicos, acumulándose éstos en el medio extracelular, siendo más acusada la liberación de aminoácidos en condiciones diazotróficas que en presencia de nitrato (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Esta pérdida de aminoácidos es un

fenotipo característico de las estirpes cianobacterianas que tienen inactivados los sistemas de transporte de aminoácidos neutros (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997).

Una vez caracterizados los tres sistemas de transporte de aminoácidos principales de *Anabaena* sp. PCC 7120, se estudió si los mutantes generados también perdían aminoácidos al medio de cultivo. Se analizó mediante HPLC el medio carente de una fuente de nitrógeno combinado en el que se habían cultivado las estirpes PCC 7120, 216 (*hetR*, estirpe incapaz de desarrollar heterocistos; véase la Tabla 2.1 de *Materiales y Métodos*), CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 (Figura 3.42). La incubación se efectuó durante un máximo de 48 h debido a que el mutante 216 no se puede mantener durante largos periodos de tiempo en medios carentes de nitrógeno combinado.

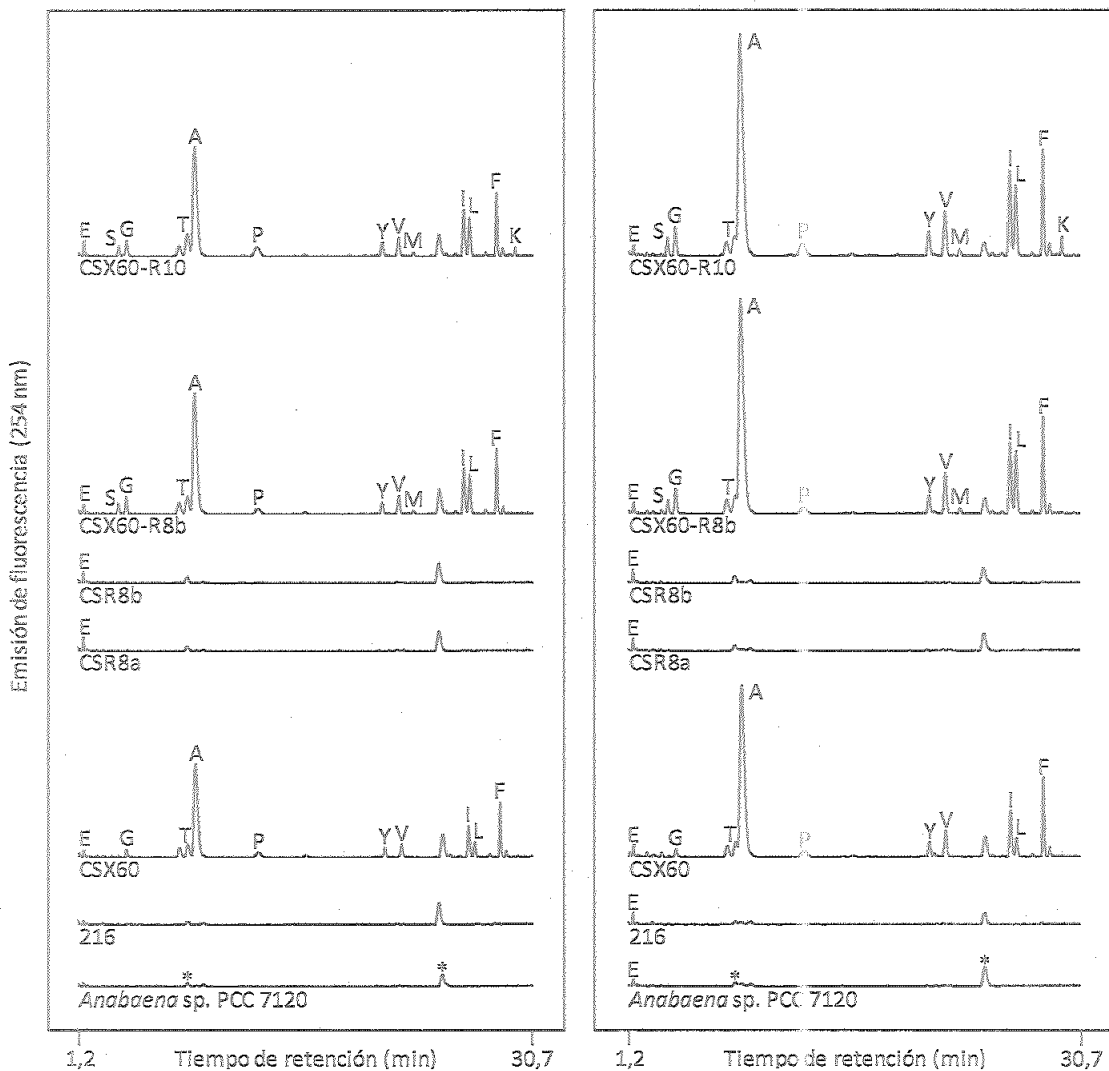


Figura 3.42. Acumulación de aminoácidos en el medio extracelular de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10. Filamentos cultivados en medio BG11 con aire:CO₂ (99:1); en presencia de antibióticos en el caso de las estirpes mutantes) se lavaron, se homogeneizaron y se incubaron en medios BG11, con aire:CO₂ durante 24 (izquierda) o 48 h (derecha), tomándose entonces muestras del medio de cada estirpe que se analizaron mediante HPLC. Se presentan cromatogramas y se indican los aminoácidos que aparecen a concentraciones más elevadas, así como los picos que corresponden a algunos de los reactivos empleados para la separación de los aminoácidos en las muestras analizadas, que se señalan con asteriscos (*). Los resultados detallados de estos análisis se presentan en la Tabla 3.15 para las 24 h y en la Tabla 3.16 para las 48 h.

El mutante CSX60 (*natA*), afectado en el transportador N-I, acumulaba aminoácidos hidrofóbicos en el medio, entre los que se encontraban Ala, Ile, Leu, Phe, Pro Tyr, Val y Gly, y pequeñas cantidades del

aminoácido polar Thr, todos ellos incorporados principalmente a través de la permeasa N-I; los que se liberaban a niveles más altos eran Ala, Phe, Ile y Leu (véase también Montesinos, 1997; Picossi, 2003). Es interesante indicar que no se detectó acumulación significativa de Glu, aún siendo el aminoácido más abundante en el citoplasma cianobacteriano (5-20 mM), mientras que la Ala se liberaba a los niveles más altos, pese a que su concentración intracelular es de aproximadamente 0,4 mM (Labarre *et al.*, 1987; Coronil y Lara, 1991). Estos resultados indican que la acumulación de aminoácidos en el medio no se produce como resultado de la lisis celular. Por el contrario, los mutantes CSR8a (*natH::pCSV3*) y CSR8b (*natH::pRL424*) del sistema de transporte N-II no acumulaban aminoácidos en el medio a niveles significativos por encima de los mostrados por las estirpes control PCC 7120 y 216. Los mutantes dobles CSX60-R8b (*natA natH*) y CSX60-R10 (*natA bgtA*) acumulaban algunos aminoácidos a niveles considerablemente más altos que los observados no sólo con las estirpes PCC 7120 y 216, sino también con su estirpe parental CSX60. La acumulación en el medio externo tendía a correlacionar con la hidrofobicidad, si bien la Ala se acumulaba entre 5 y 10 veces más que el resto de aminoácidos, alcanzando una concentración de 100 μ M, aproximadamente, en el medio extracelular de cultivos incubados durante 48 h en ausencia de nitrógeno combinado (Figura 3.42; Tabla 3.16). Por otra parte, para algunos aminoácidos la concentración extracelular se duplicaba desde las 24 h a las 48 h de incubación, siendo esto especialmente notable para la Ala debido a su abundancia.

Tabla 3.15. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 24 h. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de los mutantes 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivados en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se lavaron, se resuspendieron en medio BG11, y se incubaron en ausencia de nitrógeno combinado con aire:CO₂ (99:1) durante 24 h. Muestras de las suspensiones celulares se filtraron y los medios carentes de células se analizaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm la desviación estándar de la media de cuatro (dos para la estirpe CSX60-R10) determinaciones independientes.

Aminoácido	Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo (μ M)						
	PCC 7120	216	CSX60	CSR8a	CSR8b	CSX60-R8b	CSX60-R10
Básicos							
L-Arg	0,18 \pm 0,10	0,17 \pm 0,10	0,22 \pm 0,12	0,22 \pm 0,12	0,18 \pm 0,11	0,27 \pm 0,14	0,72 \pm 0,02
L-Lys	0,13 \pm 0,04	0,11 \pm 0,003	0,13 \pm 0,03	0,13 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,90 \pm 0,005
L-His	0,39 \pm 0,12	0,04 \pm 0,03	0,11 \pm 0,08	0,22 \pm 0,01	0,25 \pm 0,03	0,10 \pm 0,07	0,58 \pm 0,03
Ácidos							
L-Asp	0,25 \pm 0,18	0,20 \pm 0,14	0,39 \pm 0,28	0,25 \pm 0,18	0,30 \pm 0,22	0,36 \pm 0,25	0,52 \pm 0,01
L-Glu	1,52 \pm 0,26	1,36 \pm 0,36	1,60 \pm 0,08	2,17 \pm 0,17	2,02 \pm 0,06	1,91 \pm 0,01	2,51 \pm 0,21
Neutros polares							
L-Asn	0,26 \pm 0,06	0,37 \pm 0,16	0,37 \pm 0,15	0,25 \pm 0,05	0,48 \pm 0,23	1,32 \pm 0,75	0,35 \pm 0,02
L-Gln	0,26 \pm 0,003	0,17 \pm 0,01	0,18 \pm 0,05	1,20 \pm 0,69	0,25 \pm 0,03	0,21 \pm 0,05	0,25 \pm 0,002
L-Ser	0,22 \pm 0,16	0,21 \pm 0,15	0,32 \pm 0,23	0,20 \pm 0,14	0,25 \pm 0,18	1,33 \pm 0,94	2,67 \pm 0,03
L-Thr	1,92 \pm 0,28	1,23 \pm 0,18	3,07 \pm 0,38	1,88 \pm 0,27	1,96 \pm 0,05	4,32 \pm 0,48	6,15 \pm 0,13
L-Cistina	0,28 \pm 0,01	0,12 \pm 0,11	0,11 \pm 0,08	0,18 \pm 0,06	0,12 \pm 0,09	0,12 \pm 0,08	0,26 \pm 0,002
Hidrofóbicos							
Gly	0,49 \pm 0,09	0,37 \pm 0,004	1,77 \pm 0,24	0,97 \pm 0,39	0,95 \pm 0,33	6,43 \pm 1,69	3,71 \pm 0,08
L-Ala	0,85 \pm 0,60	0,15 \pm 0,11	38,22 \pm 0,19	1,03 \pm 0,42	1,10 \pm 0,46	45,09 \pm 3,95	45,52 \pm 1,09
L-Val	0,34 \pm 0,12	0,34 \pm 0,18	3,42 \pm 0,13	0,46 \pm 0,10	0,47 \pm 0,08	4,52 \pm 0,29	4,99 \pm 0,14
L-Met	0,12 \pm 0,06	0,12 \pm 0,06	0,13 \pm 0,09	0,11 \pm 0,08	0,10 \pm 0,07	0,80 \pm 0,10	1,07 \pm 0,03
L-Ile	1,71 \pm 1,04	0,45 \pm 0,12	7,52 \pm 0,37	1,14 \pm 0,45	1,11 \pm 0,55	10,47 \pm 0,35	9,92 \pm 0,25
L-Leu	0,50 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	3,33 \pm 0,10	0,39 \pm 0,08	0,44 \pm 0,11	7,80 \pm 0,82	8,66 \pm 0,22
Aromáticos							
L-Tyr	0,32 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04	2,24 \pm 0,27	0,25 \pm 0,0002	0,19 \pm 0,04	2,67 \pm 0,30	3,52 \pm 0,07
L-Phe	0,18 \pm 0,04	0,27 \pm 0,13	8,52 \pm 0,24	0,23 \pm 0,06	0,22 \pm 0,06	9,32 \pm 0,38	9,43 \pm 0,25
Únicos							
L-Pro	0,15 \pm 0,07	0,02 \pm 0,01	2,52 \pm 0,31	0,12 \pm 0,05	0,12 \pm 0,06	2,87 \pm 0,34	5,57 \pm 0,002

Tabla 3.16. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 48 h. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de los mutantes 216, CSX60, CSR8a, CSR8b, CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivados en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se lavaron, se resuspendieron en medio BG11, y se incubaron en ausencia de nitrógeno combinado con aire:CO₂ (99:1) durante 48 h. Muestras de las suspensiones celulares se filtraron y los medios carentes de células se analizaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm la desviación estándar de la media de cuatro (dos para la estirpe CSX60-R10) determinaciones independientes. nd, no detectado.

Aminoácido	Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo (μ M)						
	PCC 7120	216	CSX60	CSR8a	CSR8b	CSX60-R8b	CSX60-R10
Básicos							
L-Arg	0,18 \pm 0,10	0,17 \pm 0,12	0,25 \pm 0,10	0,22 \pm 0,12	0,21 \pm 0,10	0,29 \pm 0,13	1,34 \pm 0,05
L-Lys	0,09 \pm 0,06	0,12 \pm 0,01	0,16 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,15 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	1,78 \pm 0,03
L-His	0,37 \pm 0,13	0,10 \pm 0,07	0,08 \pm 0,05	0,07 \pm 0,05	0,25 \pm 0,05	0,14 \pm 0,10	nd
Ácidos							
L-Asp	0,25 \pm 0,18	0,24 \pm 0,17	0,53 \pm 0,38	0,31 \pm 0,22	0,32 \pm 0,23	0,46 \pm 0,32	0,98 \pm 0,06
L-Glu	1,74 \pm 0,10	2,25 \pm 0,04	2,91 \pm 0,29	2,2 \pm 0,17	2,69 \pm 0,15	2,52 \pm 0,12	2,45 \pm 0,07
Neutros polares							
L-Asn	0,27 \pm 0,06	0,37 \pm 0,26	0,45 \pm 0,32	0,21 \pm 0,15	0,35 \pm 0,13	2,19 \pm 1,55	nd
L-Gln	0,22 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02	0,22 \pm 0,005	0,28 \pm 0,04	0,30 \pm 0,002	0,33 \pm 0,02
L-Ser	0,22 \pm 0,16	0,26 \pm 0,18	0,31 \pm 0,22	0,25 \pm 0,18	0,25 \pm 0,18	1,91 \pm 1,35	4,67 \pm 0,28
L-Thr	1,78 \pm 0,18	1,51 \pm 0,12	3,95 \pm 0,24	1,84 \pm 0,14	2,27 \pm 0,26	5,11 \pm 0,16	5,58 \pm 0,02
L-Cistina	0,17 \pm 0,12	0,12 \pm 0,09	0,16 \pm 0,11	0,12 \pm 0,09	0,12 \pm 0,09	0,39 \pm 0,27	0,98 \pm 0,53
Hidrofóbicos							
Gly	0,31 \pm 0,04	0,31 \pm 0,01	2,21 \pm 0,12	0,30 \pm 0,06	0,35 \pm 0,04	5,50 \pm 0,69	7,12 \pm 0,24
L-Ala	1,59 \pm 0,08	0,19 \pm 0,14	76,98 \pm 3,83	1,12 \pm 0,10	1,02 \pm 0,09	91,16 \pm 10,80	105,25 \pm 5,42
L-Val	0,28 \pm 0,17	0,28 \pm 0,12	4,13 \pm 2,62	0,28 \pm 0,17	0,28 \pm 0,15	6,14 \pm 4,11	12,50 \pm 0,51
L-Met	0,31 \pm 0,07	0,23 \pm 0,02	3,10 \pm 2,02	0,21 \pm 0,005	0,22 \pm 0,01	5,08 \pm 2,43	1,89 \pm 0,06
L-Ile	0,25 \pm 0,07	0,19 \pm 0,06	10,85 \pm 0,09	0,24 \pm 0,08	0,31 \pm 0,14	16,96 \pm 0,21	19,51 \pm 0,45
L-Leu	0,21 \pm 0,11	0,13 \pm 0,06	4,91 \pm 0,09	0,17 \pm 0,06	0,19 \pm 0,07	15,34 \pm 0,40	17,62 \pm 0,60
Aromáticos							
L-Tyr	0,23 \pm 0,14	0,20 \pm 0,10	2,01 \pm 1,40	0,29 \pm 0,18	0,29 \pm 0,16	2,47 \pm 1,71	6,41 \pm 0,15
L-Phe	0,15 \pm 0,07	0,44 \pm 0,05	13,15 \pm 0,04	0,22 \pm 0,12	0,23 \pm 0,13	16,70 \pm 0,29	17,72 \pm 0,53
Únicos							
L-Pro	0,14 \pm 0,08	0,10 \pm 0,05	3,97 \pm 0,11	0,02 \pm 0,01	nd	4,35 \pm 0,02	8,41 \pm 0,04

Cualquiera que sea el mecanismo por el que tenga lugar la liberación de aminoácidos, ya sea difusión o exportación activa, el transportador N-I parece ser esencial en la recuperación de los aminoácidos que se pierden, existiendo cierta contribución del sistema N-II, tal como indican los resultados obtenidos con los mutantes dobles. Sin embargo, en ausencia del sistema N-II, el transportador N-I es suficiente para recuperar los aminoácidos liberados.

3.3. Papel de la alanina en el metabolismo diazotrófico.

Como se ha descrito en el apartado 3.4.2, los mutantes afectados en los sistemas de transporte N-I y N-II liberaban aminoácidos, principalmente hidrofóbicos, al medio de cultivo, de los cuales la Ala era el que se encontraba a concentraciones más elevadas. Esta liberación de aminoácidos hidrofóbicos es mayor en condiciones diazotróficas que en cultivos con nitrato (Picossi, 2003). Asimismo, estos mutantes presentaban una deficiencia en el crecimiento en condiciones diazotróficas que se podría relacionar con la pérdida adicional de aminoácidos que tiene lugar en estas condiciones.

3.5.1. Liberación de alanina dependiente de fijación de N₂.

Para determinar si la liberación adicional de aminoácidos hidrofóbicos en medios carentes de nitrógeno combinado era dependiente de la fijación de N₂, se utilizó una estirpe mutante incapaz de desarrollar heterocistos que también estaba afectada en la permeasa N-I. Esta estirpe se generó anteriormente a este trabajo transfiriendo por conjugación el plásmido pCSX60, utilizado para la inactivación del gen *natA* (véase la Figura 3.1 y el apartado 3.1.1) (Montesinos, 1997), a la estirpe 216 de *Anabaena* sp., incapaz de desarrollar heterocistos, dando lugar a una estirpe que se denominó CSS18 (Picossi *et al.*, 2005).

La liberación de aminoácidos al medio de cultivo se analizó mediante HPLC en el mutante CSS18 utilizando como controles la estirpe silvestre y los mutantes 216 y CSX60. Las cuatro estirpes se incubaron con aire:CO₂ (99:1) en medios sin nitrógeno combinado durante 48 h, analizándose muestras del medio de cada cultivo que se habían tomado a las 24 y 48 h de incubación. En el medio de cultivo de la estirpe CSS18 (*hetR natA*) se acumulaban los aminoácidos hidrofóbicos Ala, Ile, Leu, Phe, Pro, Tyr, Val y Gly (Tabla 3.17; datos de 24 h no mostrados), al igual que en el caso de los mutantes del sistema N-I (véase el apartado 3.4.2). Sin embargo, de todos los aminoácidos liberados, la Ala y la Thr y, en menor medida, la Leu y la Val, eran los únicos cuya liberación estaba afectada negativamente de forma significativa por la mutación *hetR* (Tabla 3.17), siendo la acumulación de Ala en el medio un 50% inferior en la estirpe CSS18 que en el mutante CSX60, y la de Leu y Val un 25% inferior, aproximadamente. Es interesante destacar que los tres aminoácidos indicados son de la familia del piruvato, sintetizados a partir de éste, siendo la Ala el primer aminoácido de dicha ruta de síntesis. Por otra parte, la acumulación de Pro en el medio era 2,2 veces más elevada en la estirpe CSS18 que en el mutante CSX60 (Tabla 3.17), lo cual sugería que la liberación de Pro podría ser estimulada por el estrés resultante de la deficiencia de nitrógeno. Estos resultados sugieren que la liberación más elevada de Ala en condiciones diazotróficas en la estirpe mutante CSX60 requiere la presencia de heterocistos, dado que la liberación disminuía en el mutante doble *hetR natA*.

Tabla 3.17. Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo de las estirpes PCC 7120, 216, CSX60 y CSS18 incubadas en ausencia de nitrógeno combinado durante 48 h. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de los mutantes 216, CSX60 y CSS18 cultivados en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) se lavaron, se resuspendieron en medio BG11, y se incubaron en ausencia de nitrógeno combinado con aire:CO₂ (99:1) durante 48 h. Muestras de las suspensiones celulares se filtraron y los medios carentes de células se analizaron como se describe en el apartado 2.4.3 de *Materiales y Métodos*. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm la desviación estándar de la media de dos determinaciones independientes, y se presentan en nmoles·(mg de proteína)⁻¹. nd, no detectado.

Aminoácido	Aminoácidos acumulados en el medio de cultivo (nmoles·[mg de proteína] ⁻¹)				Ratio CSS18/CSX60
	PCC 7120	216	CSX60	CSS18	
Neutros polares					
L-Thr	1,41 \pm 0,58	1,75 \pm 0,49	8,69 \pm 1,11	5,27 \pm 0,49	0,61
Hidrofóbicos					
Gly	0,81 \pm 0,16	1,30 \pm 0,03	14,0 \pm 2,37	13,3 \pm 0,16	0,95
L-Ala	0,62 \pm 0,18	1,07 \pm 0,15	109 \pm 17,7	54,9 \pm 6,22	0,50
L-Val	0,01 \pm 0,01	0,06 \pm 0,04	7,98 \pm 1,45	6,14 \pm 0,52	0,77
L-Met	0,01 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	2,05
L-Ile	0,14 \pm 0,03	nd	11,3 \pm 2,22	14,0 \pm 1,25	1,24
L-Leu	0,21 \pm 0,03	0,62 \pm 0,09	6,42 \pm 1,30	4,64 \pm 0,30	0,72
Aromáticos					
L-Tyr	0,16 \pm 0,09	0,11 \pm 0,05	4,14 \pm 1,36	4,17 \pm 1,06	1,01
L-Phe	0,12 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02	13,8 \pm 3,33	16,4 \pm 2,72	1,18
Únicos					
L-Pro	0,10 \pm 0,05	0,39 \pm 0,07	4,70 \pm 0,71	10,3 \pm 1,04	2,20

3.5.2. Asimilación de alanina.

Estos resultados sugirieron que la Ala podría ser un aminoácido producido por los heterocistos y asimilado por las células vegetativas. Para determinar si este aminoácido puede ser utilizado como fuente de nitrógeno combinado, se analizó el crecimiento de la estirpe silvestre y de los mutantes del sistema N-I en presencia de Ala, incluyendo la estirpe CSR4 como control del mutante *natE* (véase el apartado 3.1.1). Se estudió el crecimiento en medio sólido con nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado, suplementando o no con L-Ala a concentración 1 mM (Figura 3.43). En este ensayo de crecimiento se empleó también como control el mutante 216 (*hetR*), que es incapaz de desarrollar heterocistos.

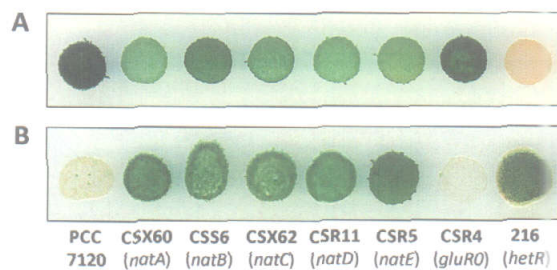


Figura 3.43. Crecimiento de las estirpes PCC 7120, CSX60, CSS6, CSX62, CSR11, CSR5, CSR4 y 216 en medios sin nitrógeno combinado sin suplementar o suplementado con Ala a concentración 1 mM. A, crecimiento en medio sólido en ausencia de nitrógeno combinado (BG11₀). B, crecimiento en el mismo medio que en el panel A suplementado con 1 mM de L-Ala. Las suspensiones celulares inoculadas contenían 70 ng de Chl y se incubaron durante 11 días.

Las pruebas de crecimiento en medios con nitrato no mostraron diferencias apreciables entre la estirpe silvestre y los mutantes utilizados, tanto en ausencia como en presencia de Ala. No obstante, parecía existir una leve inhibición por Ala del crecimiento de las estirpes PCC 7120 y CSR4 (datos no mostrados). En medios carentes de nitrógeno combinado, como se esperaba, la estirpe 216 no crecía, pero su crecimiento se rescataba por adición de alanina a concentración 1 mM (Figura 3.43). Por su parte, los mutantes *nat* presentaban un crecimiento ligeramente superior en presencia de Ala que en su ausencia. Por último, las estirpes silvestre y CSR4 no crecían en presencia de Ala. Aunque se desconoce el motivo de esta inhibición, ésta se alivia en los mutantes del sistema N-I, que tienen un transporte de Ala disminuido. Estos resultados indicaban que el aminoácido Ala puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por la estirpe 216 y puede rescatar el crecimiento de los mutantes N-I en ausencia de otra fuente de nitrógeno combinado.

3.5.3. Inactivación y fenotipo de un mutante de la alanina deshidrogenasa.

Dado que la Ala puede ser el sustrato o el producto de varias enzimas en *Anabaena* sp. PCC 7120, entre ellas la alanina deshidrogenasa y algunas transaminasas (Flores y Herrero, 1994), se decidió estudiar con mayor detalle el papel de algunas de estas enzimas en el metabolismo diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120. La búsqueda en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) de genes que pudieran estar relacionados con el metabolismo de la Ala reveló la existencia de dos ORFs, *alr2355* y *alr4853*, anotadas como posibles alanina deshidrogenasa (AlaDH) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT), respectivamente. Estas dos enzimas están implicadas en el metabolismo de la Ala en muchas bacterias y podrían tener también un papel importante en *Anabaena* sp. PCC 7120, por lo que se decidió inactivarlas mediante inserción de DNA exógeno. La inactivación de dichas ORFs se llevó a cabo tanto en *Anabaena* sp. PCC 7120 como en el mutante 216 (*hetR*), con objeto de tratar de identificar la enzima responsable del crecimiento de esta última en medio BG11₀ en presencia de Ala. Sin embargo, la ORF *alr4853* inactivada no se consiguió segregar en ninguno de los casos, sugiriendo que

la enzima GPT es esencial en el metabolismo de esta cianobacteria, por lo que sólo se describirá la inactivación de la ORF *alr2355*.

Para la inactivación de la ORF *alr2355* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 545 pb, utilizando como molde DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *alr2355-7120-1* y *alr2355-7120-2*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH* I (Figura 3.44; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pMBL-T, generándose el plásmido pCSR80, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH* I, y el fragmento interno de *alr2355* con los extremos *BamH* I se clonó en el vector pCSV3 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR88. Este plásmido se transfirió a las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 y 216 mediante conjugación y se seleccionaron colonias resistentes a los antibióticos Sm y Sp, que habrían incorporado el plásmido transferido mediante recombinación simple.

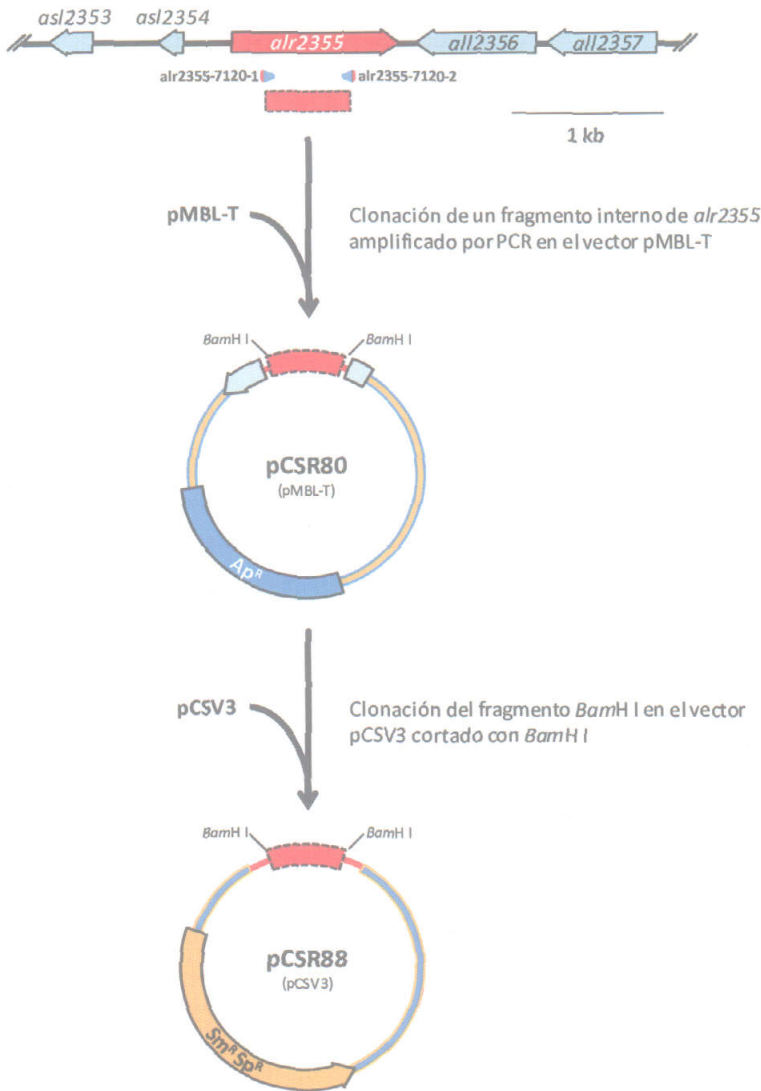


Figura 3.44. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR88 para la inactivación de *alr2355*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH* I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región de la ORF *alr2355* se estudió mediante PCR en varios clones seleccionados resultantes de cada conjugación, utilizando como molde DNA genómico de las estirpes

analizadas y las parejas de oligonucleótidos *alr2355-7120-3/alr2355-7120-4* y *alr1004-7120-3/alr1004-7120-4* (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 910 pb en la estirpe silvestre y de 4.957 pb en los clones que tuvieran insertado en *alr2355* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 907 pb (Figura 3.45). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia de la ORF *alr1004*, localizada en otra región del genoma. Este análisis permitió comprobar que la inserción del plásmido se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *alr2355* en cada clon seleccionado, y que los cromosomas mutantes resultantes se encontraban completamente segregados en ambos casos, por lo que los mutantes pasaron a denominarse estirpe CSR24, el derivado de la estirpe silvestre, y CSR25 el que derivaba del mutante 216.

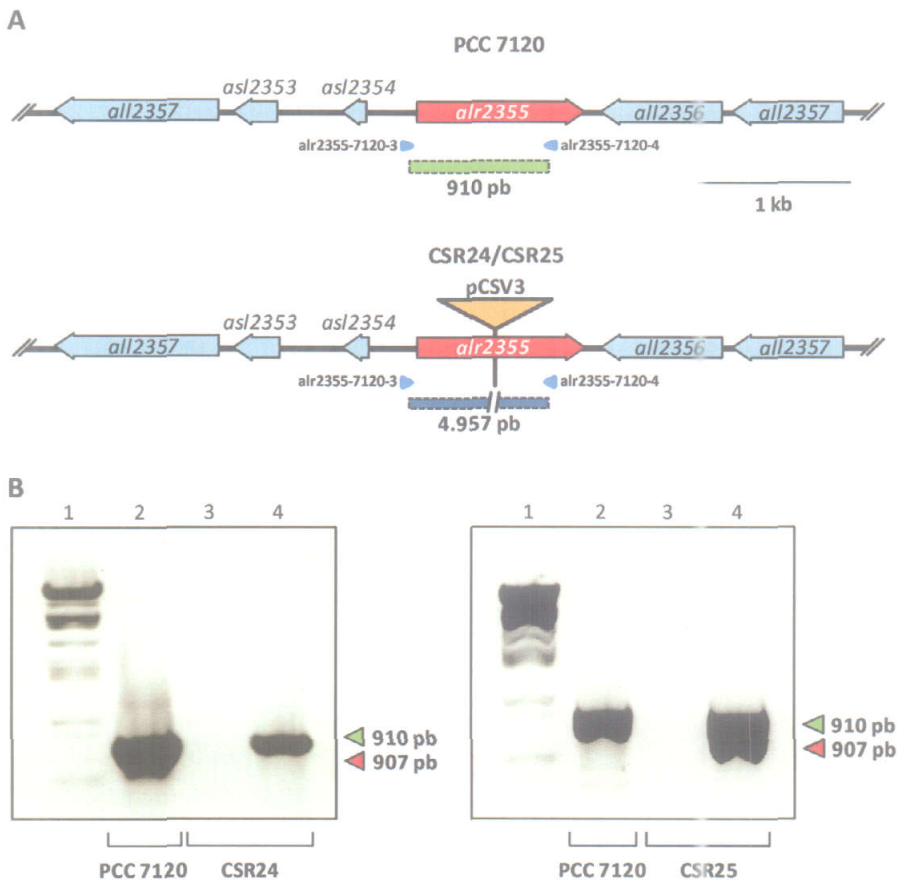


Figura 3.45. Estructura cromosómica de los mutantes CSR24 y CSR25 en la región de la ORF *alr2355*. A, representación esquemática de la región cromosómica que contiene la ORF *alr2355* de la estirpe PCC 7120 y los mutantes CSR24 y CSR25. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre, CSR24 y CSR25. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de las estirpes CSR24 y CSR25. En cada análisis de PCR (izquierda y derecha), en la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *alr2355-7120-3/alr2355-7120-4* para la estirpe silvestre y mutante, respectivamente (triángulo verde), y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control *alr1004-7120-3/alr1004-7120-4* para la estirpe mutante (triángulo rojo).

La actividad AlaDH se midió en extractos crudos de la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120 y del mutante CSR24 (*alr2355*). Dado que en *Anabaena cylindrica* la actividad AlaDH es más elevada en cultivos incubados en ausencia de nitrógeno combinado que en presencia de amonio (Rowell y Stewart, 1975), se decidió incubar las dos estirpes mencionadas en medios BG11₀C con aire:CO₂ (99:1) durante 48 h, en

ausencia de antibióticos. Dichos cultivos se emplearon para preparar extractos crudos como se describe en el apartado 2.6 de *Materiales y Métodos*.

Tabla 3.18. Ensayo de la actividad alanina deshidrogenasa en extractos crudos de las estirpes PCC 7120 y CSR24. Células de las estirpes PCC 7120 y CSR24 (*alr2355::pCSV3*) cultivadas en medio BG11C (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se lavaron con medio BG11₀C, se homogeneizaron y se utilizaron para inocular medio BG11₀C sin antibióticos, incubándose durante 48 h para la preparación de extractos crudos y determinando la actividad AlaDH según se describe en *Materiales y Métodos*. Los controles se realizaban omitiendo la adición de piruvato, NH₄Cl o extracto crudo. La actividad de la enzima AlaDH se presenta en nmoles de NADH oxidado·mg de proteína⁻¹·min⁻¹ como la media ± la desviación estándar de la media de tres ensayos independientes.

Ensayo	Actividad AlaDH (nmoles·[mg prot] ⁻¹ ·min ⁻¹)
<i>Estirpe PCC 7120</i>	
Completo	30,8 ± 0,57 (3)
- piruvato	1,11 ± 0,00 (3)
- NH ₄ ⁺	1,49 ± 0,43 (3)
- extracto crudo	0,00 (1)
<i>Estirpe CSR24</i>	
Completo	1,47 ± 0,49 (3)

Los resultados obtenidos indicaban que la estirpe mutante CSR24 carecía de actividad AlaDH (Tabla 3.18), ya que la actividad de oxidación de NADH que aún se observaba en el extracto del mutante era similar a la de los controles con extractos crudos de la estirpe silvestre sin piruvato o amonio. Esta actividad residual podría deberse a otras oxidasas de NADH presentes en los extractos crudos. Estos resultados permiten concluir que la ORF *alr2355* corresponde al gen *ald* de *Anabaena* sp. PCC 7120, que determina la AlaDH.

También se analizó el metabolismo de Ala mediante cromatografía en capa fina (TLC). Para ello se incubaron suspensiones celulares de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 y CSR24 con [¹⁴C]Ala durante 10 y 60 min y se visualizaron los metabolitos producidos a partir de la Ala incorporada. Los resultados indicaban que *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta un catabolismo de Ala muy activo (Figura 3.46A), metabolizándose ésta a Glu, Gln y otros metabolitos no identificados. Por su parte, el mutante CSR24 presentaba en general las mismas manchas radiactivas que la estirpe silvestre, si bien algunas diferían en cuanto a intensidad (Figura 3.46B). Éste era el caso de la Ala, que se acumulaba, y del Glu y la Gln, que se producían en menor cantidad que en la estirpe silvestre. La mayor acumulación de Ala en el mutante *ald* era consistente con la ausencia de enzima AlaDH, si bien este aminoácido también parece ser metabolizado por otras vías, como podría ser la glutamato-piruvato transaminasa (GPT).

Se estudió el crecimiento de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y del mutante CSR24 en medios líquidos en presencia de nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado (Figura 3.47). En medio líquido con nitrato (BG11), las dos estirpes presentaban un crecimiento similar, mientras que en medio carente de nitrógeno combinado (BG11₀), la estirpe CSR24 mostraba una tasa de crecimiento un 47% inferior a la de la estirpe silvestre (Figura 3.47). Este resultado indica que en *Anabaena* sp. PCC 7120 la enzima AlaDH es necesaria para un crecimiento óptimo en condiciones diazotróficas.

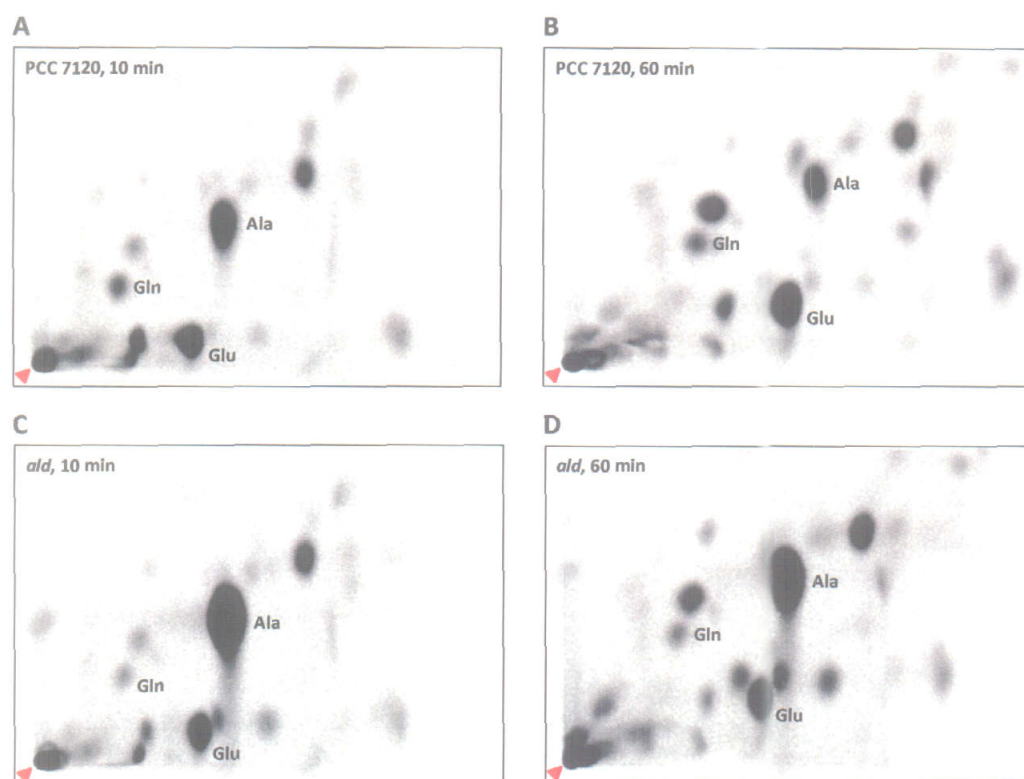


Figura 3.46. Catabolismo de Ala en *Anabaena* sp. PCC 7120 y el mutante CSR24. Suspensiones de células de las estirpes silvestre y CSR24 (*ald*), cultivadas en medio BG11₀C con aire:CO₂ (99:1), se sometieron a ensayos de transporte con [¹⁴C]Ala a concentración 3 μM durante 10 ó 60 min. Las células se recogieron por filtración y el contenido de las mismas se analizó mediante TLC bidimensional y autorradiografía, tal como se describe en el apartado 2.4.1 de *Materiales y Métodos*. Se muestra el resultado de la TLC de la estirpe silvestre incubada con [¹⁴C]Ala durante 10 min (A) o 60 min (B) y del mutante CSR24 incubado durante 10 min (C) o 60 min (D). Se indican los metabolitos a los que corresponden algunas de las manchas radiactivas. En cada panel el origen de la cromatografía se señala con un triángulo rojo. La disolución de [¹⁴C]Ala sustrato sólo producía la mancha de Ala.

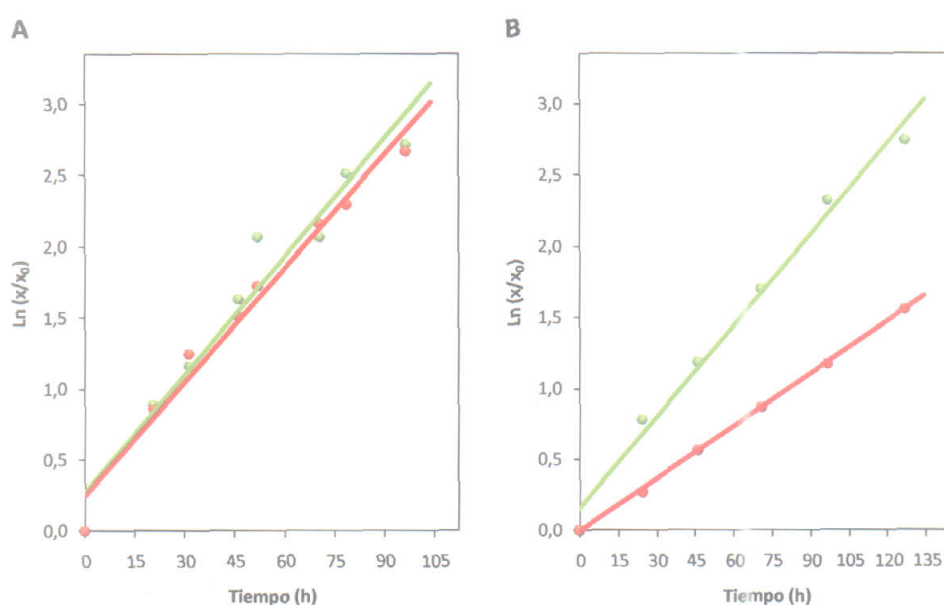


Figura 3.47. Crecimiento en medio líquido de las estirpes PCC 7120 y CSR24. Células de las estirpes PCC 7120 y CSR24 (*ald::pCSV3*) cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se lavaron con medio BG11₀, se homogeneizaron y se utilizaron para inocular medios BG11 (A) y BG11₀ (B) sin antibióticos, a razón de 0,2 μg Chl·mL⁻¹, incubándose en condiciones de cultivo durante 5-7 días para la determinación de las constantes de crecimiento, μ, como se describe en *Materiales y Métodos*. En verde se presenta la estirpe silvestre y en rojo el mutante CSR24. Los valores de μ, en días⁻¹, fueron: 0,66 (PCC 7120, BG11); 0,64 (CSR24, BG11); 0,52 (PCC 7120, BG11₀); 0,30 (CSR24, BG11₀).

También se estudió el crecimiento de las estirpes CSR24 y CSR25, en comparación con las respectivas estirpes parentales PCC 7120 y 216, en ausencia y en presencia de Ala a concentración 1 mM, tanto en medios con nitrato como carentes de nitrógeno combinado (Figura 3.48). En medios sin Ala, en presencia de nitrato no se observaban diferencias entre las cuatro estirpes (Figura 3.48A), mientras que en BG11₀ no se apreciaban diferencias entre los mutantes CSR24 (*ald*) y CSR25 (*hetR ald*) y sus respectivos parentales (Figura 3.48C). En medios con nitrato y 1 mM de Ala se observaba una ligera inhibición en el crecimiento de todas las estirpes estudiadas quizás con la excepción del mutante *hetR* (Figura 3.48B). En medios sin nitrato había una fuerte inhibición del crecimiento de la estirpe silvestre por Ala, que era incluso mayor en el mutante CSR24 (Figura 3.48D). Por otro lado, se observaba cierto crecimiento de la estirpe 216, también anulado en la estirpe CSR25. Estos resultados corroboran la existencia de un efecto tóxico de la Ala (véase también la Figura 3.43), que es más severo cuando se inactiva la enzima AlaDH. Por ello, no está claro si esta enzima es necesaria para la utilización de Ala como fuente de nitrógeno en la estirpe 216. La asimilación podría ser mediada por otra enzima, teniendo la AlaDH un papel limitado a la protección frente a la inhibición por Ala

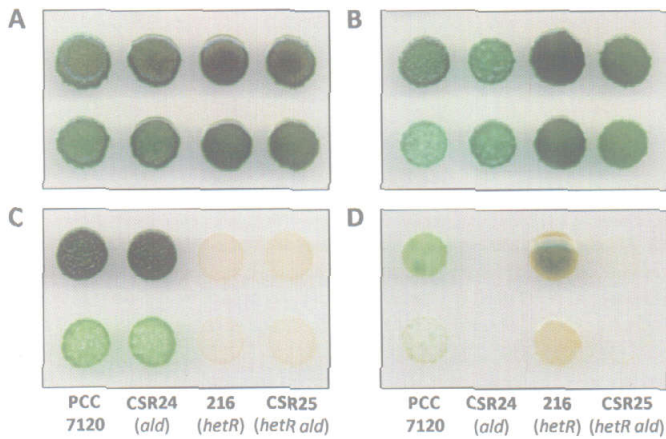


Figura 3.48. Ensayo de crecimiento de las estirpes PCC 7120, CSR24, 216 y CSR25 en medios sin o con 1 mM de Ala. A, crecimiento en medio con nitrato. B, crecimiento en medio con nitrato suplementado con 1 mM de Ala. C, crecimiento en ausencia de nitrógeno combinado. D, crecimiento en medio BG11₀ en presencia de Ala 1 mM. En los paneles A, B y C se muestra el crecimiento de las estirpes indicadas durante 8 días, mientras que en el D durante 13 días. En cada panel, las suspensiones celulares de la línea superior fueron inoculadas con 70 ng de Chl y las de la línea inferior con 7 ng de Chl.

3.6. Otros sistemas de transporte estudiados.

Como se ha descrito en los apartados 3.1 y 3.2, el transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 es llevado a cabo mayoritariamente por los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt. El trabajo que permitió la identificación de estos transportadores se llevó a cabo paralelamente al estudio de otros cuya caracterización se presenta en este apartado.

3.6.1. Caracterización de la ORF *all0342*.

En el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) se encuentra una ORF de 1.311 pb cuyo producto de 437 residuos de aminoácidos presenta homología con permeasas de Glu y Asp dependientes de H⁺/Na⁺ (Slotboom *et al.*, 1999) de la familia DAACS (véase el apartado 1.2.2 de *Introducción*). Dado que All0342 podría determinar una proteína de membrana, la topología de esta proteína se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según estas predicciones, la proteína All0342 presentaría 9 segmentos en hélice α , de los

que 5 corresponderían a hélices α primarias y los 4 restantes a hélices α secundarias, y sus extremos se dispondrían en el interior celular el amino y en el periplasma el carboxilo (Figura 3.49).

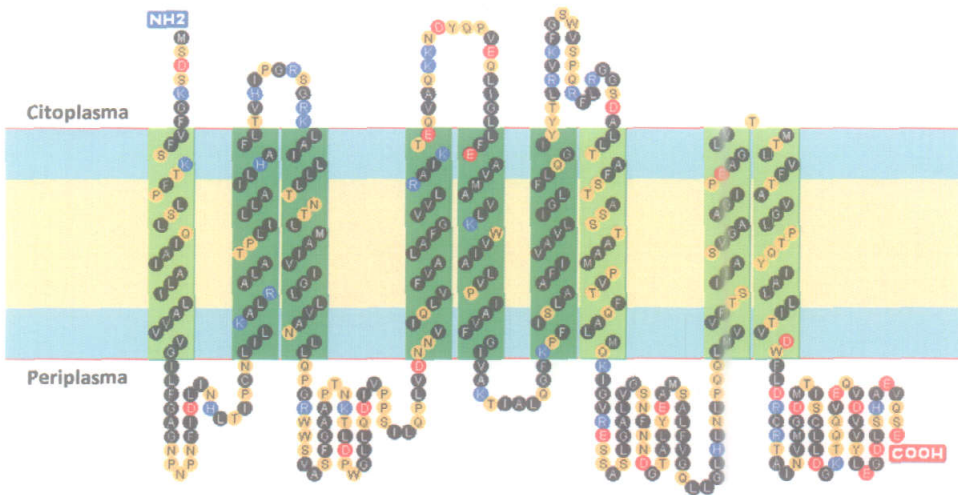


Figura 3.49. Predicción de la topología de la proteína All0342 de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Para la inactivación de la ORF *all0342* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 596 pb, utilizando para ello DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *all0342*-7120-1 y *all0342*-7120-2, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *Bam*H I (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T, generándose el plásmido pCSR1, el cual se digirió con la endonucleasa *Bam*H I y el fragmento interno de *all0342* con los extremos *Bam*H I se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR13 (Figura 3.50). Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación y se seleccionaron colonias resistentes a Nm, que habrían incorporado el plásmido transferido en el cromosoma mediante recombinación simple.

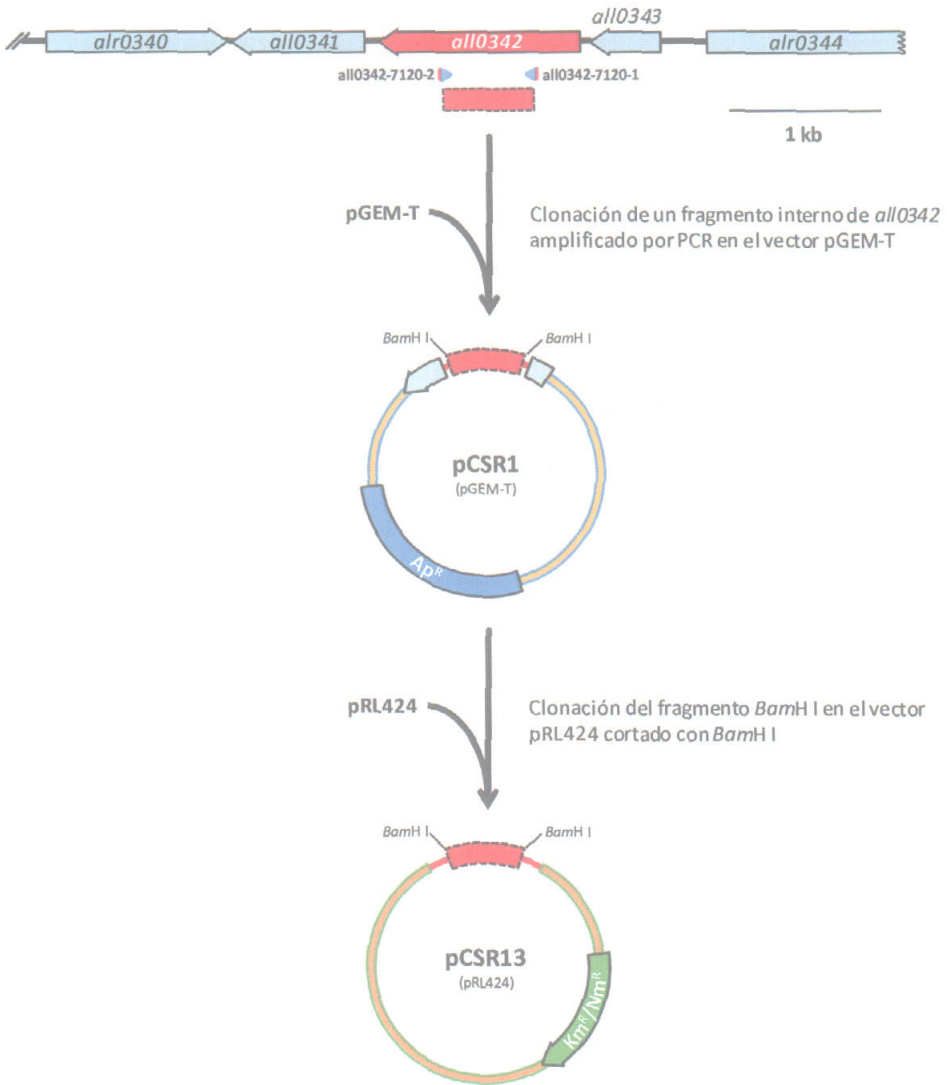


Figura 3.50. Representación esquemática de la construcción del plásmidos pCSR13. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH I*) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se estudió mediante análisis de Southern en varios clones resultantes de la conjugación. El DNA se digería con la endonucleasa *EcoR V* y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *all0342*, obtenido por restricción del plásmido pCSR1 con la diana *BamH I*, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.51A). En este análisis se esperaba una banda de 2,8 kb en la estirpe silvestre y de 6,0 kb en los clones que tuvieran insertado en el genoma el plásmido transferido (Figura 3.51B). Este análisis permitió determinar que la inserción del plásmido había tenido lugar correctamente en los clones analizados interrumpiendo dicha ORF y que los cromosomas mutantes resultantes estaban completamente segregados, no quedando cromosomas silvestres remanentes. El clon seleccionado para su posterior análisis se denominó estirpe CSR1.

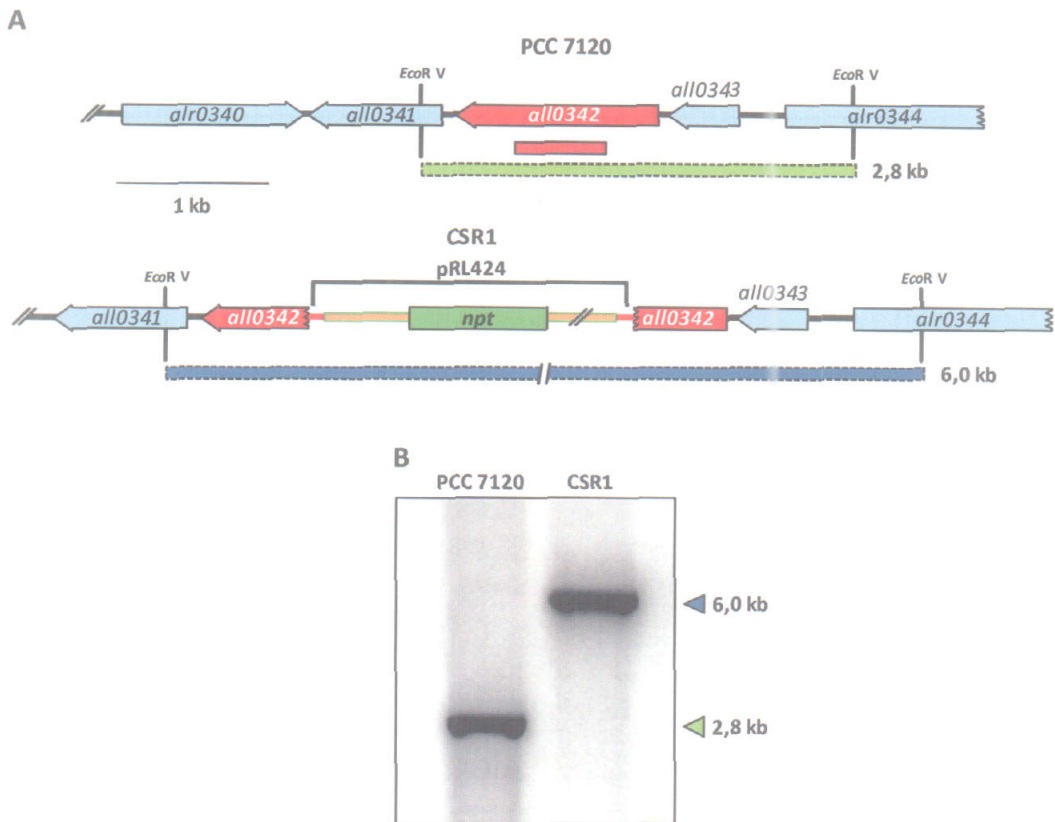


Figura 3.51. Estructura cromosómica de la estirpe CSR1 en la región de la ORF *all0342*. A, región cromosómica que contiene la ORF *all0342* en la estirpe silvestre PCC 7120 y el mutante CSR1. Se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de la estirpe mutante, la localización de la sonda empleada (barra roja), las dianas de restricción *EcoR V* y los tamaños esperados en el análisis de Southern para las bandas de las estirpes silvestre (barra verde) y CSR1 (barra azul). B, resultado del análisis de Southern para determinar la estructura genómica de la estirpe CSR1. Se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulo verde) y mutante (triángulo azul).

Para determinar el fenotipo de transporte de la estirpe CSR1 (*all0342::pRL424*) se realizaron una serie de ensayos de transporte de aminoácidos comparando este mutante con la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 3.19). Excepto para Lys, Asp y Phe, el mutante CSR1 mostraba un aumento significativo de la actividad de transporte de los aminoácidos ensayados, siendo ésta en muchos casos un 50% mayor que en la estirpe silvestre (Figura 3.52). Este fenotipo sería consistente con que *All0342* funcionara como un sistema de exportación de aminoácidos, dado que lo que se mide en los ensayos de transporte es la acumulación de aminoácidos (retención de radiactividad) en las células, que entrarían a través de los sistemas de transporte ya descritos. Los resultados obtenidos sugieren que esta permeasa podría corresponder con un exportador general de aminoácidos, dado que no se observa ninguna preferencia por uno determinado o por un grupo de aminoácidos con características químicas similares, sino que reconoce tanto aminoácidos neutros, polares e hidrofóbicos, como básicos y ácidos.

Para investigar si la estirpe mutante CSR1 presentaba alguna deficiencia en el crecimiento, éste se estudió en medio sólido en ausencia de nitrógeno combinado y en presencia de nitrato. En ninguno de los medios empleados se observaron diferencias con respecto a la estirpe PCC 7120 (datos no mostrados).

Tabla 3.19. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR1. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de la estirpe mutante CSR1 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se sometieron a ensayos de transporte durante 10 min con los [14 C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μ M. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles \cdot (mg Chl) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se indica entre paréntesis. También entre paréntesis se indica la ORF inactivada en la estirpe CSR1. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles \cdot [mg Chl] $^{-1}\cdot$ [10 min] $^{-1}$)	
	PCC 7120	CSR1 (<i>all0342</i>)
Básicos		
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	195 \pm 12,5 (3)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	140 \pm 8,40 (2)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	132 \pm 5,28 (3)
Ácidos		
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	38,8 \pm 2,19 (4)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	16,9 \pm 1,56 (4)
Neutros polares		
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	158 \pm 6,48 (4)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	239 \pm 34,3 (3)
Hidrofóbicos		
Gly	200 \pm 3,30 (15)	252 \pm 5,50 (3)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	286 \pm 6,03 (3)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	177 \pm 12,0 (3)
Aromáticos		
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	109 \pm 8,32 (3)
Únicos		
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	198 \pm 13,1 (4)

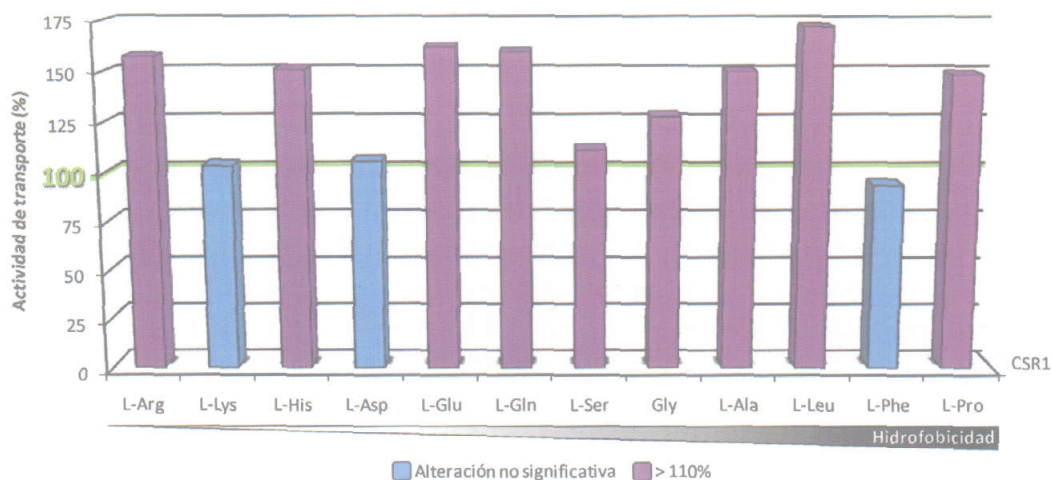


Figura 3.52. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSR1. Las actividades de transporte del mutante se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en una escala de colores en función del grado de actividad. En violeta se indican las actividades de transporte que son significativamente superiores a la de la estirpe silvestre y en azul el resto de actividades que no difieren de forma significativa de las correspondientes de la estirpe silvestre.

3.6.2. Sistema de transporte de ácidos carboxílicos.

En el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko *et al.*, 2001) se encuentran tres ORFs, *alr3026*, *alr3027* y *all3028*, cuyos productos hipotéticos serían homólogos a las subunidades de los sistemas de transporte de tipo TRAP-T (Figura 3.53). Como se describió en los apartados 1.1.4 de *Introducción*, las

permeasas de tipo TRAP-T están constituidas por dos subunidades transmembrana y una periplásmica de unión de sustrato y funcionan utilizando un gradiente de iones como fuente de energía. En el caso de las tres ORFs mencionadas, las proteínas de membrana estarían determinadas por las ORFs *alr3026* y *alr3027*, mientras que la proteína periplásmica de unión de sustrato sería determinada por la ORF *all3028*. Dado que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito un sistema de transporte de Glu de este tipo, denominado Gtr (Quintero *et al.*, 2001), se decidió inactivar dichas ORFs mediante inserción *in vitro* de DNA exógeno.

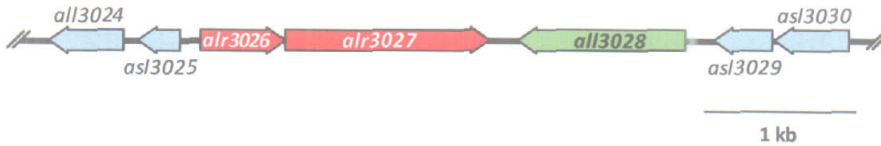


Figura 3.53. Disposición de las ORFs *alr3026*, *alr3027* y *all3028* en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indican dichas ORF, así como las que las flanquean. En rojo se indican las ORFs que determinan posibles proteínas transmembrana y en verde una posible proteína periplásmica de unión de sustrato.

La ORF *alr3026* tiene un tamaño de 555 pb y determinaría un polipéptido de 184 aminoácidos con un 63% de identidades con la proteína GtrA de la permeasa de tipo TRAP-T de Glu de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que correspondería con la subunidad transmembrana pequeña de este tipo de permeasas (véase el apartado 1.1.4 de *Introducción*). Por su parte, la ORF *alr3027* presenta un tamaño de 1.338 pb y determinaría una proteína de 445 aminoácidos con un 77% de identidades con la subunidad GtrB de la permeasa Gtr de Glu de *Synechocystis* sp. PCC 6803, que correspondería en este caso con la subunidad transmembrana grande. La topología de las proteínas Alr3026 y Alr3027 se analizó utilizando varios programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según el consenso de las predicciones, la proteína Alr3026 presentaría 4 segmentos en hélice α , de los que 1 correspondería a una hélice α primaria y los otros 3 a hélices α secundarias, disponiéndose los dos extremos de la proteína, amino y carboxilo, en el interior celular (Figura 3.54A), mientras que la proteína Alr3027 presentaría 13 segmentos en hélice α , de los que 8 corresponderían a hélices α primarias y los 5 restantes a hélices α secundarias, disponiéndose los extremos de la proteína en el interior celular el amino y en el periplasma el carboxilo (Figura 3.54B).

Por último, la ORF *all3028* tiene un tamaño de 1.095 pb y determinaría una proteína periplásmica de unión de sustrato de 364 aminoácidos que presentaría un 22% de identidades con la proteína SiaP del sistema de transporte TRAP-T de ácido siálico de *Haemophilus influenzae*, un 47% de identidades con la proteína RRC01191 de *Rhodobacter capsulatus*, perteneciente a un sistema de transporte de ácidos monocarboxílicos, un 49% de identidades con la proteína SmoM de *Rhodobacter sphaeroides* y un 51% de identidades con la proteína RPA1975 de *Rhodospseudomonas palustris*, las dos últimas anotadas como proteínas periplásmicas de unión de manitol. Sin embargo, All3028 no presenta homología con la proteína GtrC del sistema de transporte de tipo TRAP-T de Glu de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dado que la estrategia de inactivación mediante inserción de DNA exógeno no es adecuada para genes de pequeño tamaño, se descartó la inactivación de la ORF *alr3026*, procediendo a inactivar sólo las ORFs *alr3027* y *all3028*. El agrupamiento génico constituido por estas tres ORFs en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 se mantiene con la misma estructura en otras cianobacterias como *Thrichodesmium eritreaeum*.

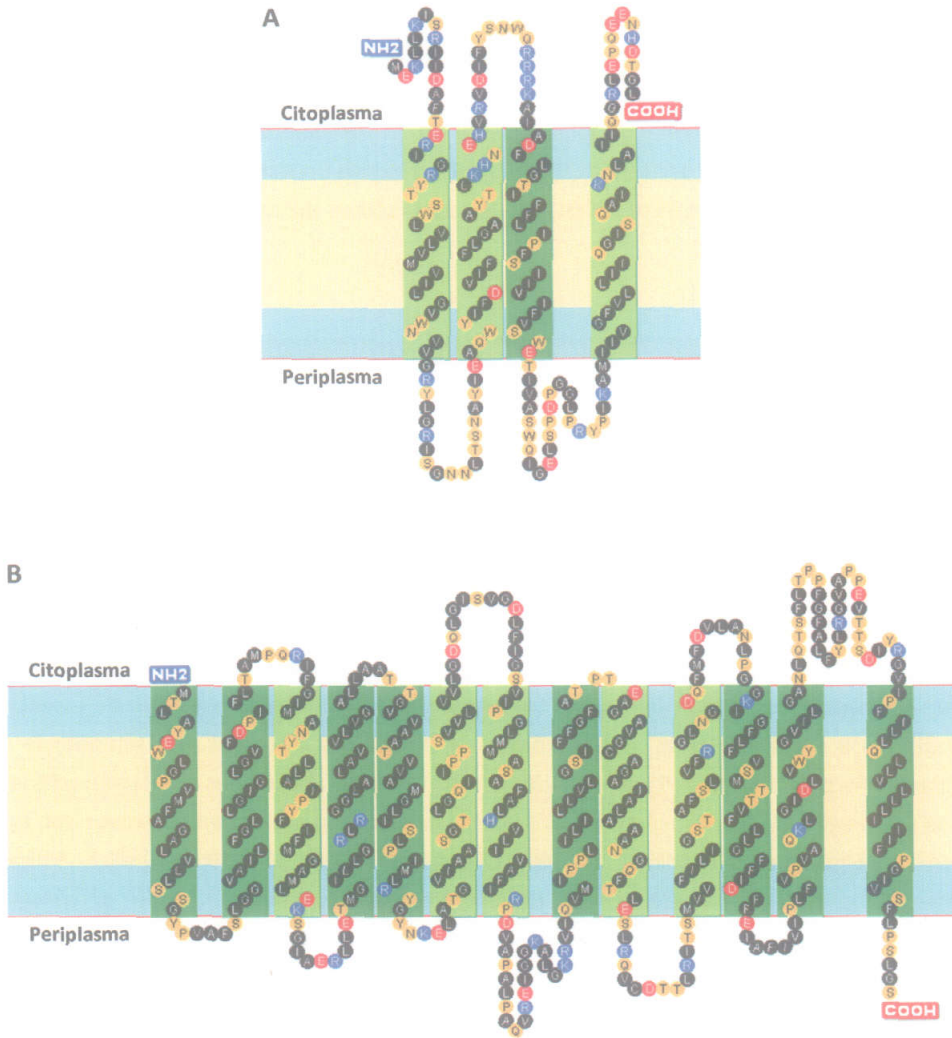


Figura 3.54. Predicción de la topología de los productos de las ORFs *alr3026* y *alr3027* de *Anabaena* sp. PCC 7120. A, predicción de la topología de Alr3026 y, B, de Alr3027. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

Para la inactivación de la ORF *alr3027* (véase el apartado 2.9.1 de *Materiales y Métodos*), se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 565 pb, utilizando como molde DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y los oligonucleótidos *alr3027*-7120-1 y *alr3027*-7120-2, que portan en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *Bam*H I (Figura 3.55; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el vector pGEM-T, generándose el plásmido pCSR5, el cual se digirió con la endonucleasa *Bam*H I, y el fragmento interno resultante de *alr3027* con los extremos *Bam*H I se clonó en los vectores pRL424 y pCSV3 previamente digeridos con la misma endonucleasa, obteniéndose los plásmidos pCSR18 y pCSR11, respectivamente. Dichos plásmidos se transfirieron a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Nm, en el caso del plásmido pCSR18, y a Sm y Sp, en el caso del plásmido pCSR11, que habrían incorporado el plásmido transferido en el genoma del receptor.

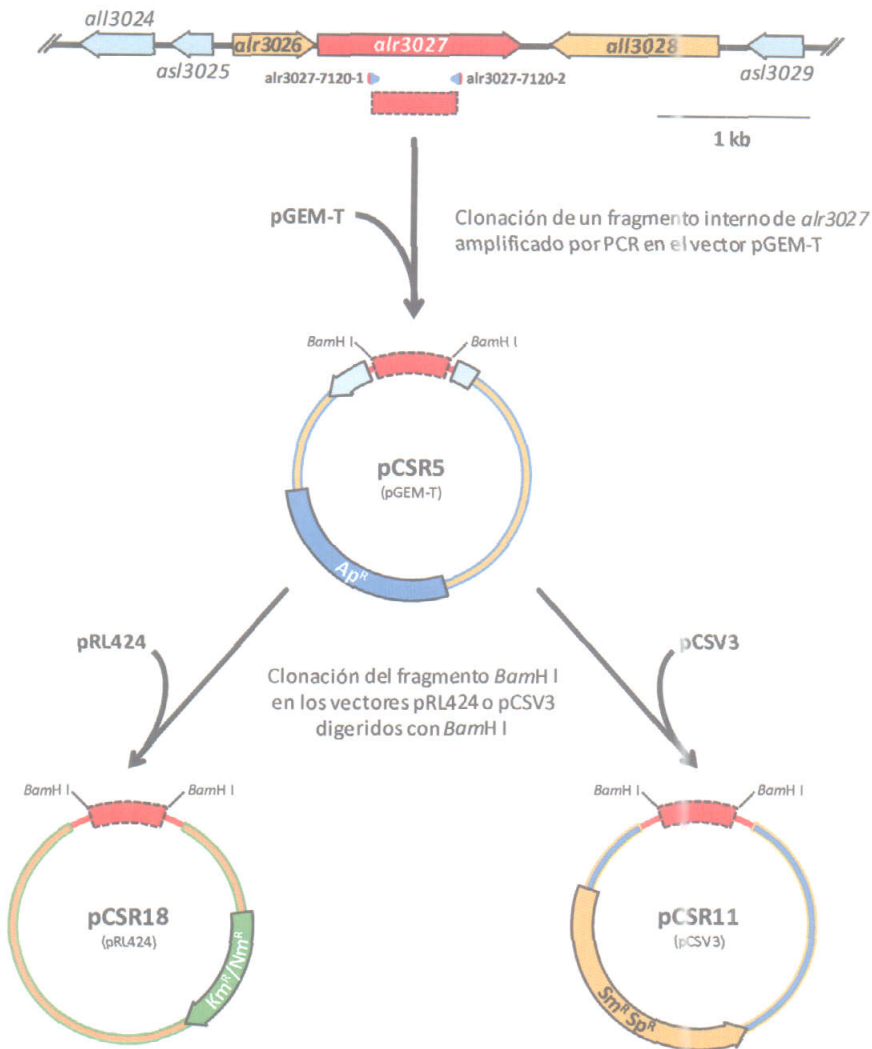


Figura 3.55. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pCSR18 y pCSR11 para la inactivación de *alr3027*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH I*) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región de *alr3027* se estudió mediante PCR en varios clones resultantes de la conjugación con el plásmido pCSR11, y mediante análisis de Southern en varios de los clones resultantes de la conjugación con el plásmido pCSR18. El análisis por PCR se realizaba utilizando DNA genómico de las estirpes analizadas como molde y las parejas de oligonucleótidos *alr3027-7120-3/alr3027-7120-4* y *alr2355-7120-1/alr2355-7120-2* (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 1.184 pb en la estirpe silvestre y de 5.231 pb en los clones que tuvieran insertado en *alr3027* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 557 pb (Figura 3.56). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia del gen *ald*, localizado en otra región del genoma, que se ha descrito en el apartado 3.5.3. Por otra parte, para el análisis de Southern el DNA se digería con la enzima de restricción *EcoR V* y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr3027*, obtenido por restricción con *BamH I* del plásmido pCSR5, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.57A). En este análisis se esperaba una banda de 2,4 kb en la estirpe silvestre y de 5,5 kb en los clones que tuvieran insertado en *alr3027* el plásmido transferido (Figura 3.57B). Los dos análisis permitieron comprobar que la inserción de los plásmidos transferidos se había

producido correctamente interrumpiendo la ORF *alr3027* en los clones seleccionados y que los cromosomas mutantes resultantes se encontraban completamente segregados en ambos casos. Uno de los clones de *Anabaena* sp. con el vector pCSV3 integrado pasó a denominarse estirpe CSR7a, y otro de los que portaban el vector pRL424 estirpe CSR7b.

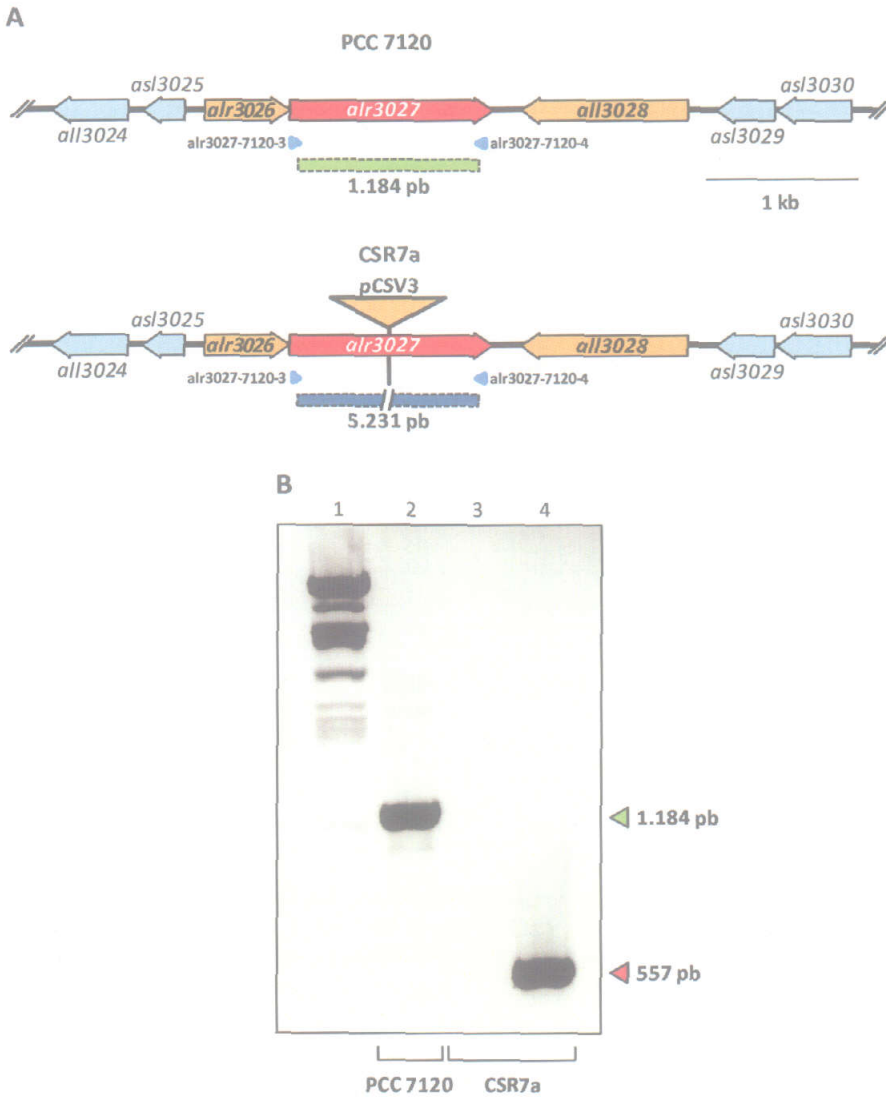


Figura 3.56. Estructura cromosómica de la estirpe CSR7a en la región de la ORF *alr3027*. A, región cromosómica que contiene la ORF *alr3027* de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 y CSR7a. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y CSR7a. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de la estirpe CSR7a. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *alr3027*-7120-3/*alr3027*-7120-4 para las estirpes silvestre y mutante (triángulo verde), respectivamente, y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control *alr2355*-7120-1/*alr2355*-7120-2 para la estirpe mutante (triángulo rojo).

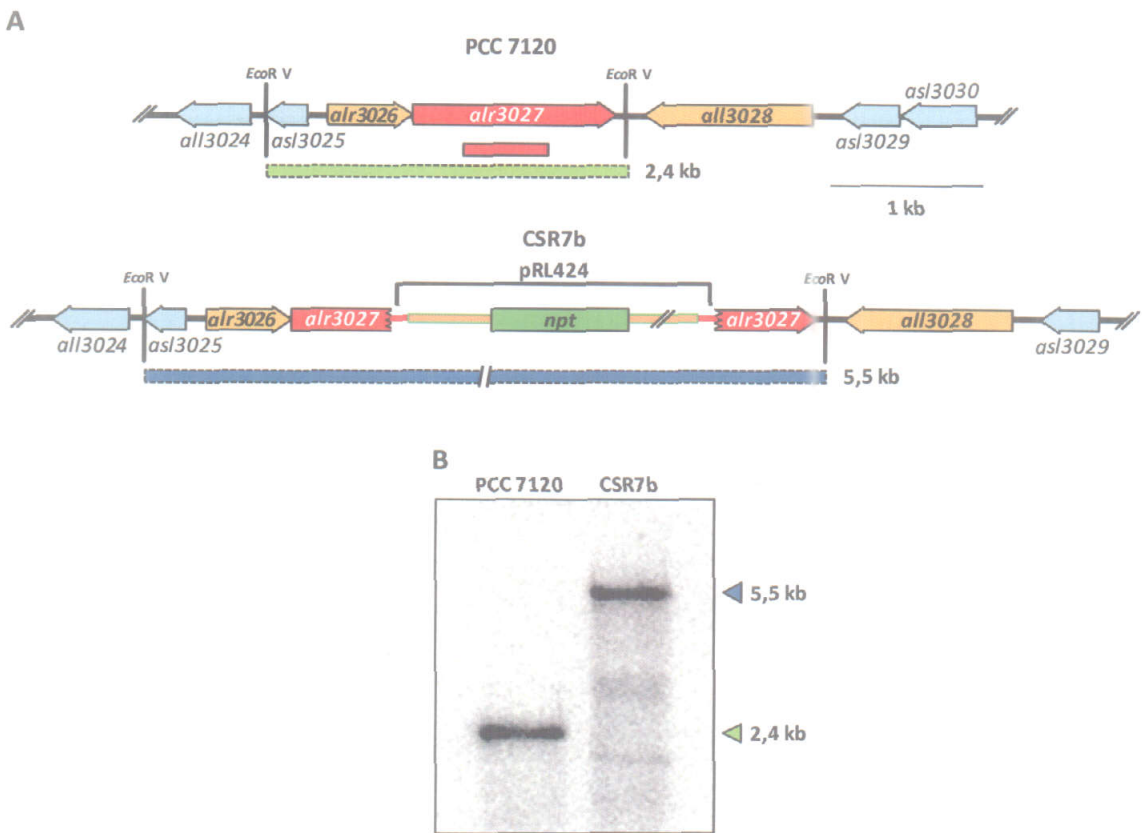


Figura 3.57. Estructura cromosómica de la estirpe CSR7b en la región *alr3027*. A, región cromosómica que contiene la ORF *alr3027* en la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120 y el mutante CSR7b. Se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de la estirpe mutante, la localización de la sonda empleada (barra roja), las dianas de restricción *EcoR V* y los tamaños esperados en el análisis de Southern para las bandas de las estirpes silvestre (barra verde) y CSR7b (barra azul). B, resultado del análisis de Southern para determinar la estructura genómica de la estirpe CSR7b. Se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulo verde) y mutante (triángulo azul).

Para la inactivación de la ORF *all3028* se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 553 pb, utilizando como molde DNA genómico de la estirpe silvestre y los oligonucleótidos *all3028-7120-1* y *all3028-7120-2*, que contienen en el extremo 5' una diana para la enzima de restricción *BamH I* (Figura 3.58; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias de los oligonucleótidos). Este fragmento de DNA se clonó en el vector pGEM-T Easy, generándose el plásmido pCSR47, el cual se digirió con la endonucleasa *BamH I*, y el fragmento interno de *all2912* con los extremos *BamH I* se clonó en el vector pCSV3 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR56. Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación y se seleccionaron colonias resistentes a los antibióticos Sm y Sp, que habrían incorporado el plásmido transferido mediante recombinación simple.

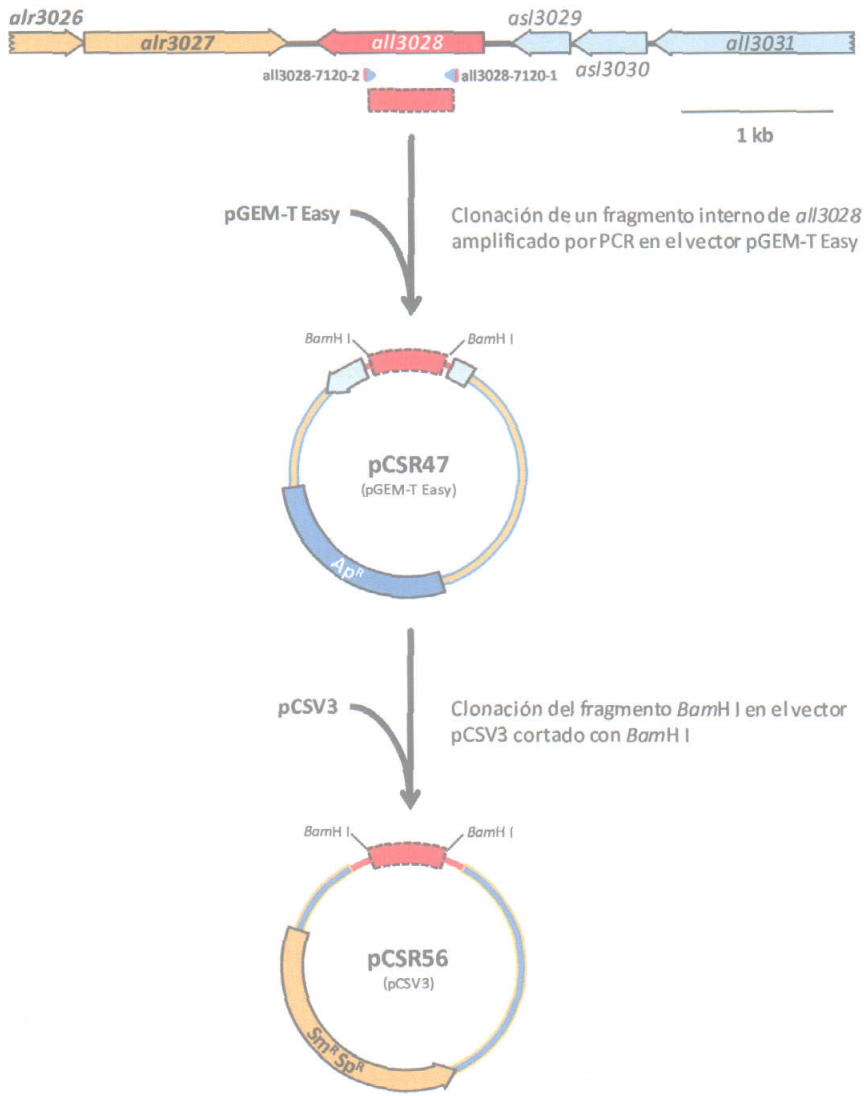


Figura 3.58. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR56 para la inactivación de *all3028*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH*I) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se analizó mediante PCR en uno de los clones seleccionados resultantes de la conjugación, utilizando para ello DNA genómico de las estirpes analizadas como molde y las parejas de oligonucleótidos *all3028-7120-3/all3028-7120-4* y *alr2355-7120-1/alr2355-7120-2* (Figura 3.59; véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). La primera pareja de oligonucleótidos produciría una banda de 900 pb en la estirpe silvestre y de 4.947 pb en los clones que tuvieran insertado en *all3028* el plásmido transferido. Dado que esta última sería difícil de amplificar debido a su tamaño, se controlaba la presencia de DNA en las muestras utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos, de la que se esperaba obtener una banda de 557 pb (Figura 3.59). Esta pareja de oligonucleótidos aparearía con la secuencia del gen *ald*, localizada en otra región del genoma. Estos análisis permitieron comprobar que la inserción del plásmido se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *all3028* y que la mutación estaba completamente segregada en el clon seleccionado (Figura 3.59), que pasó a denominarse estirpe CSR13a.

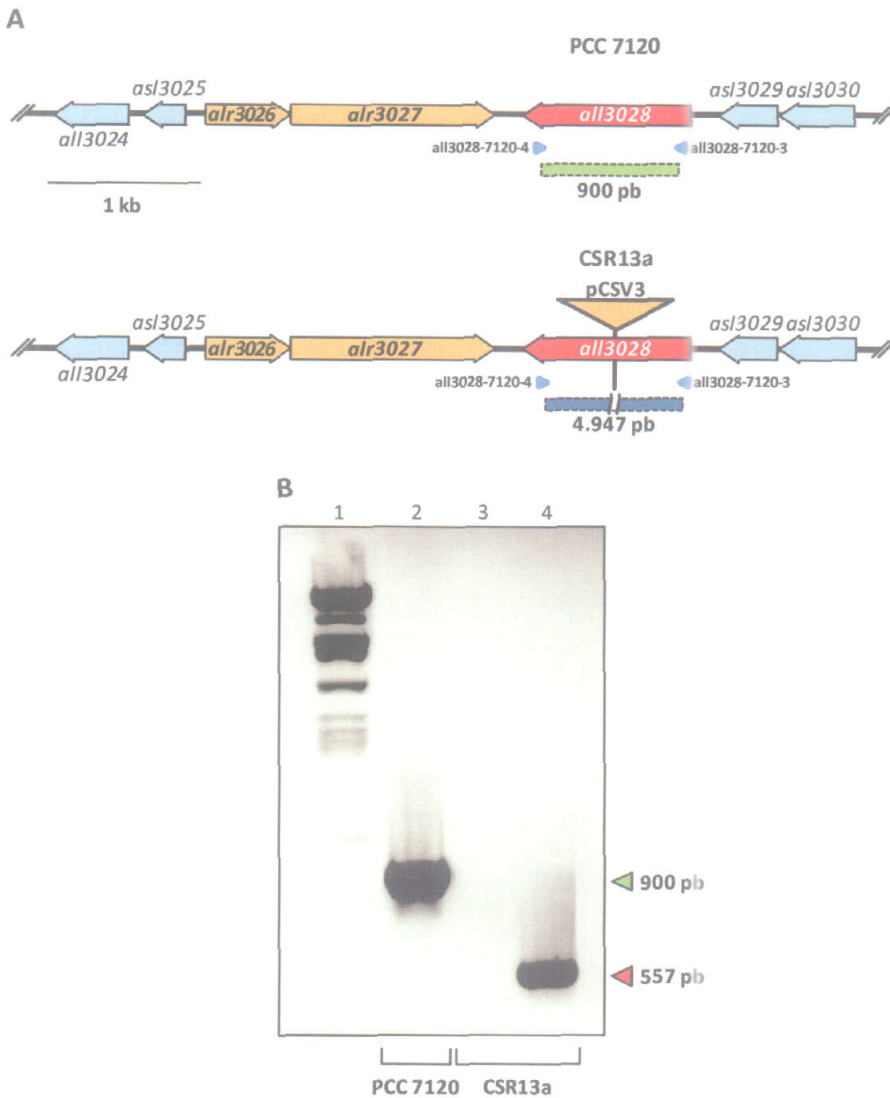


Figura 3.59. Estructura cromosómica de la estirpe CSR13a en la región de la ORF *all3028*. A, región cromosómica que contiene la ORF *all3028* en las estirpes PCC 7120 y CSR13a. Se indican los oligonucleótidos empleados para el análisis de la segregación mediante PCR y los tamaños esperados para las bandas de las estirpes silvestre y CSR13a. B, resultado del análisis de PCR para determinar la segregación de la estirpe CSR13a. En la calle 1 se muestra el marcador de tamaños utilizado, en las 2 y 3, el resultado de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *all3028-7120-3/all3028-7120-4* para las estirpes silvestre y mutante (triángulo verde), respectivamente, y en la 4 el correspondiente a la pareja de oligonucleótidos de control *alr2355-7120-1/alr2355-7120-2* para la estirpe mutante (triángulo rojo).

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de aminoácidos comparando la estirpe mutante CSR7b (*alr3027::pRL424*) con la estirpe silvestre (Tabla 3.20). Los resultados obtenidos mostraban deficiencias menores del 25% en la actividad de transporte de algunos de los aminoácidos ensayados (Figura 3.60), pero no de Glu. Estos datos no permitían concluir que este transportador estuviera involucrado en el transporte de aminoácidos pero indicaban que, en particular, no está implicado en el de Glu.

Tabla 3.20. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR7b. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de la estirpe mutante CSR7b cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se incubaron durante 10 min con los ^{14}C aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM . Las actividades de transporte se presentan, en $\text{nmoles}\cdot(\text{mg Chl})^{-1}\cdot(10 \text{ min})^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. Entre paréntesis se indica la ORF inactivada en la estirpe mutante. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos ($\text{nmoles}\cdot(\text{mg Chl})^{-1}\cdot(10 \text{ min})^{-1}$)	
	PCC 7120	CSR7b (<i>alr3027</i>)
Básicos		
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	106 \pm 13,0 (3)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	165 \pm 6,19 (2)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	77,1 \pm 8,73 (3)
Ácidos		
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	38,5 \pm 0,93 (3)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	11,3 \pm 1,10 (5)
Neutros polares		
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	76,4 \pm 7,52 (3)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	202 \pm 1,70 (2)
Hidrofóbicos		
Gly	200 \pm 3,30 (15)	157 \pm 12,3 (3)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	165 \pm 18,0 (3)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	80,4 \pm 10,4 (3)
Aromáticos		
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	119 \pm 10,5 (3)
Únicos		
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	117 \pm 15,8 (3)

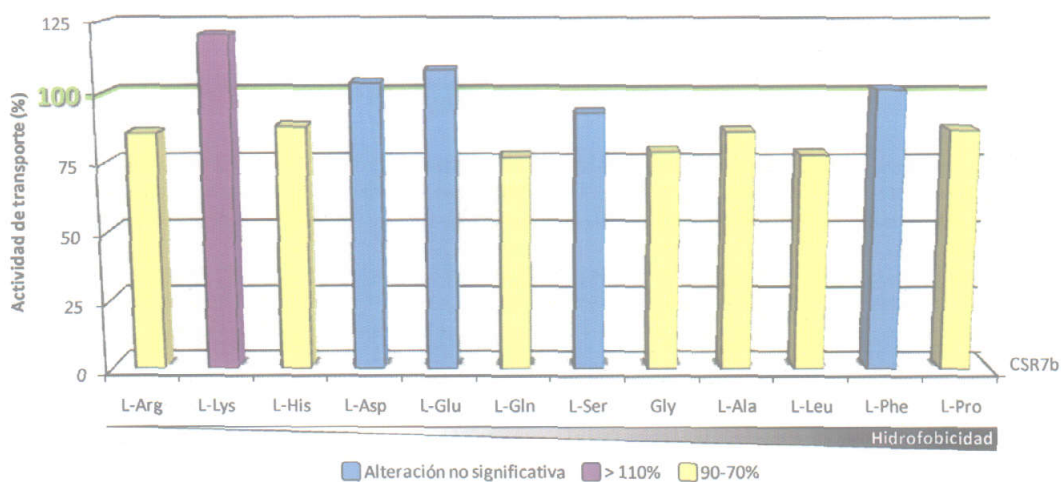


Figura 3.60. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR7b. Las actividades de transporte del mutante se indican como porcentajes respecto de la correspondiente actividad silvestre en la escala de colores que se indica.

Dado que se desconocía qué sustratos podría reconocer esta permeasa y All3028 estaba anotada como una proteína periplásmica de unión de manitol, se decidió determinar si este sistema podría estar implicado en la actividad de transporte de este sustrato. Para ello se ensayó la actividad de transporte de ^{14}C manitol a concentración 88 μM en las estirpes PCC 7120 y CSR7b, tanto cultivadas en medios con nitrato como incubadas durante 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. Los resultados obtenidos

permitieron determinar que *Anabaena* sp. PCC 7120 incorpora este sustrato con una tasa muy baja, no existiendo diferencias significativas entre las dos estirpes empleadas (datos no mostrados).

Como se mencionó antes, entre las proteínas homólogas a All3028 se encontraba la proteína periplásmica RRC01191 de *R. capsulatus*, perteneciente a una permeasa de tipo TRAP-T de 2-oxo-monocarboxilatos, entre ellos piruvato, 2-oxoalderato, 2-oxoisovalerato, 2-oxobutirato, 2-oxoisocaproato y 2-oxo-3-metilvalerato (Thomas *et al.*, 2006), por lo que se decidió ensayar la actividad de transporte de piruvato. La Figura 3.61 muestra las cinéticas de incorporación de piruvato (suministrado a varias concentraciones) de *Anabaena* sp. PCC 7120.

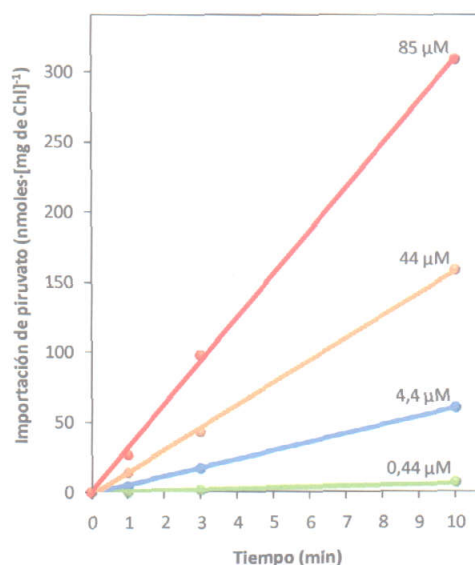


Figura 3.61. Cinética de transporte de piruvato en *Anabaena* sp. PCC 7120. Células de la estirpe PCC 7120 cultivadas en medio con nitrato se sometieron a ensayos de transporte de [14 C]piruvato a las concentraciones que se indican, como se describe en el apartado 2.2.2 de *Materiales y Métodos*. A los tiempos indicados se determinaba la cantidad de piruvato radiactivo incorporado en las células.

Los resultados obtenidos indicaban que *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta una actividad notable de transporte de piruvato y que a las concentraciones empleadas ésta muestra una dependencia lineal con respecto al tiempo al menos durante los 10 primeros minutos de ensayo (Figura 3.61). Se abordó entonces el ensayo de actividad de transporte de piruvato a diferentes concentraciones en la estirpe mutante CSR7b, tanto en filamentos cultivados con nitrato como durante 24 h en ausencia de nitrógeno combinado (Tabla 3.21; Figura 3.62), utilizando la estirpe silvestre (PCC 7120) como control.

Tabla 3.21. Actividad de transporte de piruvato de la estirpe mutante CSR7b. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de la estirpe mutante CSR7b cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) e incubadas o no en medio BG11₀ durante 24 h se incubaron durante 10 min con [14 C]piruvato a las concentraciones que se indican. Las actividades de transporte se presentan en nmoles·(mg Chl) $^{-1}$ ·(10 min) $^{-1}$. Entre paréntesis se indica la ORF inactivada en la estirpe mutante. Los ensayos de transporte de piruvato se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.2 de *Materiales y Métodos*.

Concentración de piruvato	Actividad de transporte de piruvato (nmoles·[mg Chl] $^{-1}$ ·[10 min] $^{-1}$)			
	BG11		BG11 ₀	
	PCC 7120	CSR7b (alr3027)	PCC 7120	CSR7b (alr3027)
0,44 μM	6,41	5,67	5,46	4,90
4,4 μM	59,9	50,7	51,6	45,9
44 μM	158	117	171	110
85 μM	308	177	299	222

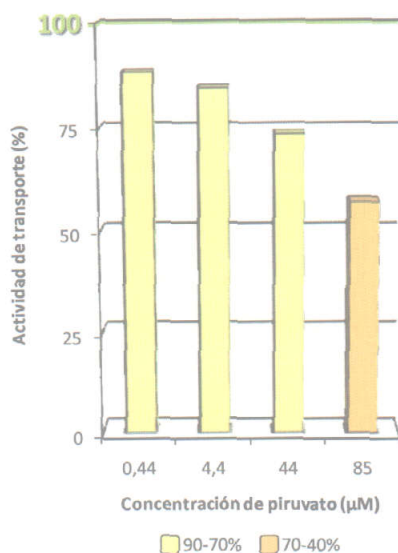


Figura 3.62. Representación esquemática de la actividad de transporte de piruvato de la estirpe mutante CSR7b en medio con nitrato. Para cada concentración de piruvato, la actividad de transporte del mutante CSR7b se indica como porcentaje respecto de la correspondiente actividad de la estirpe silvestre.

Los resultados obtenidos indicaron que la incubación sin una fuente de nitrógeno combinado no afectaba significativamente al transporte de piruvato en *Anabaena* sp. PCC 7120. Tanto en medios con nitrato como en aquellos carentes de nitrógeno combinado, la tasa de transporte de piruvato en el mutante CSR7b era inferior a la de la estirpe silvestre para todas las concentraciones ensayadas, aunque la deficiencia era más significativa a altas concentraciones (Tabla 3.21; Figura 3.62). Estos resultados sugerían que la permeasa inactivada estaba implicada en la incorporación de piruvato en *Anabaena* sp. PCC 7120, siendo una permeasa de baja afinidad para este sustrato.

Para analizar más detalladamente la posible implicación de este sistema en la incorporación de piruvato en *Anabaena* sp. PCC 7120, se decidió realizar un estudio de la cinética de transporte de este sustrato en uno de los mutantes afectados en la subunidad transmembrana grande (Alr3027) y en el mutante de la subunidad periplásmica de unión de sustrato (All3028). Para ello, se llevaron a cabo ensayos de transporte de piruvato de 10 min de duración en la estirpe silvestre y en los mutantes CSR7a (*alr3027::pCSV3*) y CSR13a (*all3028::pCSV3*) utilizando como sustrato diferentes concentraciones de [^{14}C]piruvato (Figura 3.63).

La actividad de transporte de piruvato de los mutantes CSR7a y CSR13a era menor que la que presentaba la estirpe silvestre, aunque la deficiencia no era significativa a concentraciones de sustrato bajas (Figura 3.63A). Estos resultados sugerían que Alr3027 y All3028 son dos proteínas que pertenecen al mismo sistema de transporte y apoyan que dicho sistema medie la incorporación de piruvato a concentraciones altas. Asimismo, dado que los mutantes CSR7a y CSR13a no estaban afectados en la actividad de transporte de piruvato a bajas concentraciones, y dado que aún presentaban actividades altas, un 59% y un 63%, respectivamente, con respecto a la estirpe silvestre a altas concentraciones, *Anabaena* sp. PCC 7120 podría presentar varios sistemas de transporte de piruvato. El análisis de Eadie-Hoffstee de la cinética de transporte sugiere la presencia de tres sistemas en la estirpe silvestre: uno de baja afinidad, con un valor de K_s en torno a 40 μM , otro de alta afinidad con una K_s de aproximadamente 6,4 μM y un tercero de afinidad intermedia con un valor de K_s de alrededor de 15 μM (Figura 3.63B). Por el contrario, en los mutantes CSR7a y CSR13a el análisis de Eadie-Hoffstee sugería la presencia de dos sistemas, uno con un valor de K_s en torno a 34 μM y otro de aproximadamente 3,8 μM en el caso de la estirpe CSR7a y, en el mutante CSR13a, uno con un valor de K_s de aproximadamente 24 μM y otro de

alrededor de $4,8 \mu\text{M}$. Estos resultados parecen indicar que las proteínas Alr3027 y All3028 podrían corresponder al sistema de transporte de piruvato de afinidad intermedia presente en la estirpe silvestre.

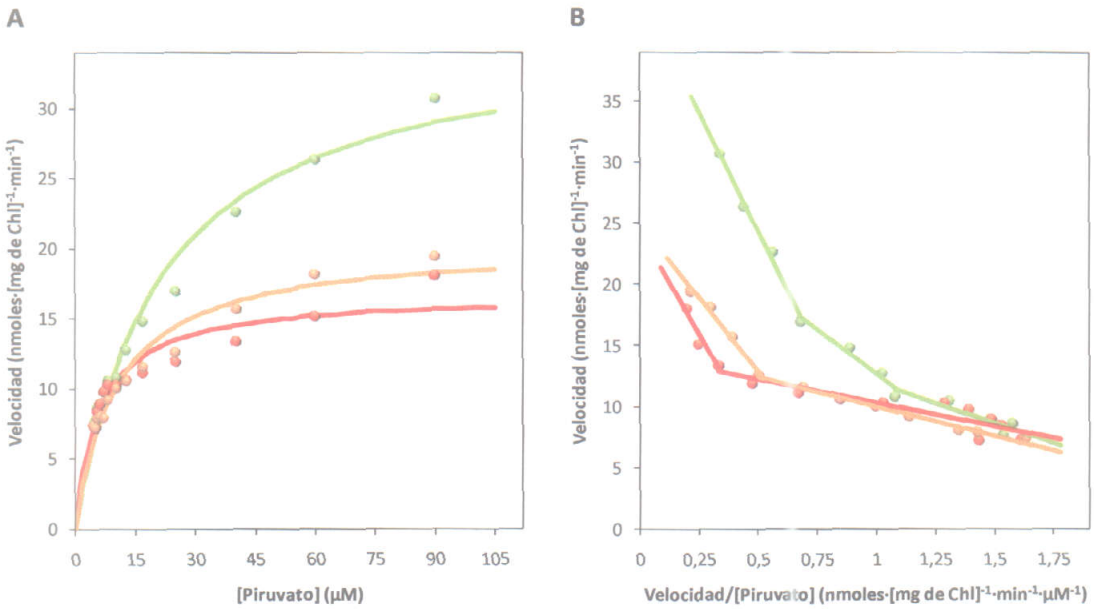


Figura 3.63. Cinética de transporte de piruvato en las estirpes PCC 7120, CSR7a y CSR13a. A, células de la estirpe silvestre y de los mutantes CSR7a y CSR13a cultivadas en medio con nitrato (en presencia de antibióticos en el caso de los mutantes) se sometieron a ensayos de transporte con ^{14}C piruvato a las concentraciones que se indican, como se describe en el apartado 2.2.2 de *Materiales y Métodos*. La gráfica muestra la representación de Michaelis-Menten de los resultados obtenidos en la cinética, representando en el eje de abscisas la concentración de sustrato y en el de ordenadas la velocidad de transporte del sustrato. B, representación de Eadie-Hoffstee que muestra los componentes cinéticos implicados en el transporte de piruvato. La actividad de transporte de la estirpe silvestre se muestra en verde, en rojo la de la estirpe CSR7a y en naranja la de la estirpe CSR13a.

Para analizar la posibilidad de que, además de piruvato, este transportador pudiera mediar la incorporación de otros 2-oxo-monocarboxilatos, se llevaron a cabo ensayos de competencia con la estirpe silvestre y los mutantes CSR7b (*alr3027::pRL424*) y CSR13a (*all3028::pCSV3*). Se realizaron ensayos de transporte de ^{14}C piruvato a concentración 5 y $50 \mu\text{M}$, con objeto de evaluar las actividades de transporte de piruvato de alta y baja afinidad, respectivamente, que se habían detectado, utilizando como competidores los 2-oxo-monocarboxilatos indicados no marcados radiactivamente, en cantidades 1 ó 10 veces superiores a las de ^{14}C piruvato. En todos los casos se observaba inhibición del transporte de piruvato, que era mayor en la estirpe silvestre que en los mutantes (Figura 3.64). No obstante, cabe destacar que la diferencia entre la estirpe silvestre y los mutantes era más acusada en los ensayos con $50 \mu\text{M}$ de ^{14}C piruvato (Figura 3.64) que con $5 \mu\text{M}$ (datos no mostrados). Estos resultados indicaban que la inhibición que se produce en la estirpe silvestre se debe en parte a un efecto sobre el sistema de transporte inactivado y son consistentes con que dicha permeasa sea de baja afinidad. Así pues, el sistema mutado constituiría un transportador de piruvato que además reconocería, de menor a mayor afinidad, 2-oxo-3-metilvalerato, 2-oxoisocaproato, 2-oxoisovalerato, 2-oxovalerato y 2-oxobutirato.

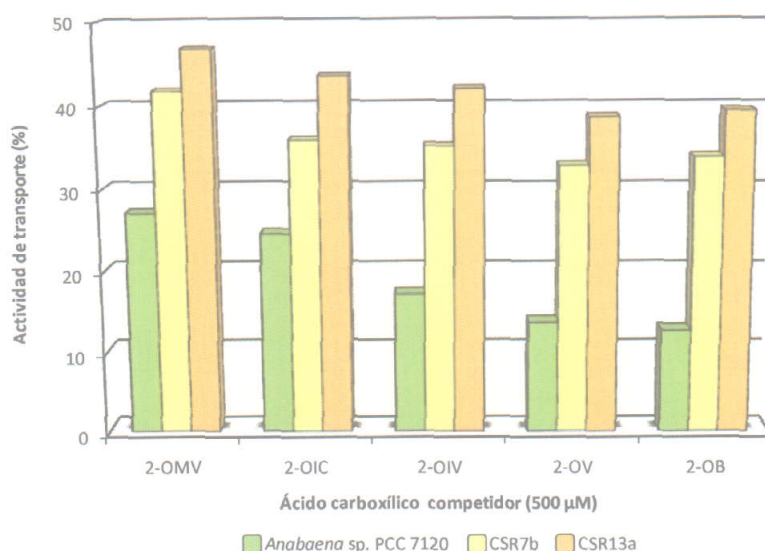


Figura 3.64. Actividad de transporte de piruvato en presencia de competidores en las estirpes PCC 7120, CSR7b y CSR13a. Células de las estirpes PCC 7120, CSR7b y CSR13a cultivadas con nitrato (en presencia de antibióticos en el caso de los mutantes) se sometieron a ensayos de transporte de 10 min de duración con ^{14}C piruvato a concentración 50 μM en presencia de los 2-oxo-monocarboxilatos que se indican a concentración 500 μM, como se describe en el apartado 2.2.2 *Materiales y Métodos*. Los 2-oxo-monocarboxilatos se presentan abreviados como 2-OMV (2-oxo-3-metilvalerato), 2-OIC (2-oxoisocaproato), 2-OIV (2-oxoisovalerato), 2-OV (2-oxovalerato) y 2-OB (2-oxobutirato), y están ordenados de menor a mayor inhibición en la estirpe silvestre. La actividad de transporte se presenta como el porcentaje de actividad respecto del mismo ensayo en ausencia de competidor, que corresponde a $206 \text{ nmoles} \cdot (\text{mg de Chl})^{-1} \cdot (10 \text{ min})^{-1}$ en la estirpe PCC 7120, $180 \text{ nmoles} \cdot (\text{mg de Chl})^{-1} \cdot (10 \text{ min})^{-1}$ en la estirpe CSR7b y $155 \text{ nmoles} \cdot (\text{mg de Chl})^{-1} \cdot (10 \text{ min})^{-1}$ en la estirpe CSR13a.

Para investigar si este sistema de transporte estaba implicado en el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120 se estudió el crecimiento de los mutantes CSR7a y CSR13a en medio sólido con nitrato y sin nitrógeno combinado, en ninguno de los cuales se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

3.6.3. Sistema de transporte N-III.

Utilizando la secuencia de las proteínas de membrana de las permeasas N-I y N-II en una búsqueda informática de posibles homólogos de las mismas en *Anabaena* sp. PCC 7120, se encontró un agrupamiento de genes que podría funcionar, al menos en parte, como un operón (Kaneko *et al.*, 2001) formado por siete ORFs: *alr2535*, *alr2536*, *alr2537*, *alr2538*, *alr2539*, *asl2540* y *alr2541* (Figura 3.65).



Figura 3.65. Disposición de las ORFs *alr2535*, *alr2536*, *alr2537*, *alr2538*, *alr2539*, *asl2540* y *alr2541* en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indican dichas ORFs y las que las flanquean. En verde se indica la ORF que podría determinar una proteína periplásmica de unión de sustrato, en naranja las ORFs que podrían determinar proteínas transmembrana, en rojo las ORFs que podrían determinar ATPasas, y en gris las ORFs *alr2537* y *asl2540* cuyos productos hipotéticos no presentan homología con ninguna proteína conocida.

De las ORFs que forman parte de este agrupamiento, *alr2535* podría determinar una proteína periplásmica de unión de sustrato, *alr2536* y *alr2538* podrían determinar proteínas transmembrana y *alr2539* y *alr2541* podrían determinar ATPasas de un sistema de transporte de tipo ABC, mientras que las ORFs *alr2537* y *asl2540* determinarían proteínas hipotéticas sin homología con otras proteínas

conocidas (Figura 3.65). Respecto a la ORF *alr2535*, ésta tiene un tamaño de 807 pb y determinaría un polipéptido de 268 aminoácidos con un 20% de identidades con la proteína periplásmica de unión de sustrato BraC del sistema de aminoácidos de cadena lateral ramificada Bra de *P. aeruginosa* (véase el apartado 1.2.3). Por otra parte, en relación a las ORFs que podrían determinar proteínas de membrana, *alr2536* y *alr2538*, éstas tienen un tamaño de 951 y 927 pb y determinarían polipéptidos de 316 y 308 residuos de aminoácidos, respectivamente. Alr2536 comparte un 31% de identidades con la proteína NatD de *Anabaena* sp. PCC 7120, un 36% con la proteína LivH de la permeasa de aminoácidos de cadena lateral ramificada LIV-I de *E. coli* y un 39% con la proteína BraD del transportador Bra de *P. aeruginosa*, mientras que Alr2538 comparte un 27% de identidades con la proteína NatC de *Anabaena* sp. PCC 7120, un 30% con la proteína LivM de la permeasa LIV-I de *E. coli* y un 33% con la proteína BraE del sistema Bra de *P. aeruginosa*. Por último, con respecto a las ORFs *alr2539* y *alr2541*, que podrían determinar proteínas de unión de ATP, éstas tienen un tamaño de 780 y 795 pb y determinarían polipéptidos de 259 y 264 aminoácidos, respectivamente. De ellas, la primera comparte un 42% de identidades con la ATPasa NatA de *Anabaena* sp. PCC 7120, un 45% con la ATPasa BraF del sistema Bra de *P. aeruginosa* y un 47% con la ATPasa LivG de la permeasa LIV-I de *E. coli*, mientras que la segunda comparte un 42% de identidades con la ATPasa NatE de *Anabaena* sp. PCC 7120, un 49% con la ATPasa BraG del transportador Bra de *P. aeruginosa* y un 51% con la ATPasa LivF de la permeasa LIV-I de *E. coli*.

La topología de los productos hipotéticos de las ORFs *alr2536* y *alr2538* se analizó mediante distintos programas de predicción de estructuras de proteínas de membrana. Según el consenso resultante de las predicciones, la proteína Alr2536 presentaría 8 segmentos transmembrana en hélice α , de los que 6 corresponderían a hélices α primarias y los 2 restantes a hélices α secundarias, disponiéndose los dos extremos de la proteína, amino y carboxilo, en el interior celular (Figura 3.66A). Por su parte, la proteína Alr2538 presentaría 8 segmentos transmembrana en hélice α , de los que una mitad corresponderían a hélices α primarias y la otra a hélices α secundarias, disponiéndose los extremos amino y carboxilo de la proteína en el interior celular (Figura 3.66B).

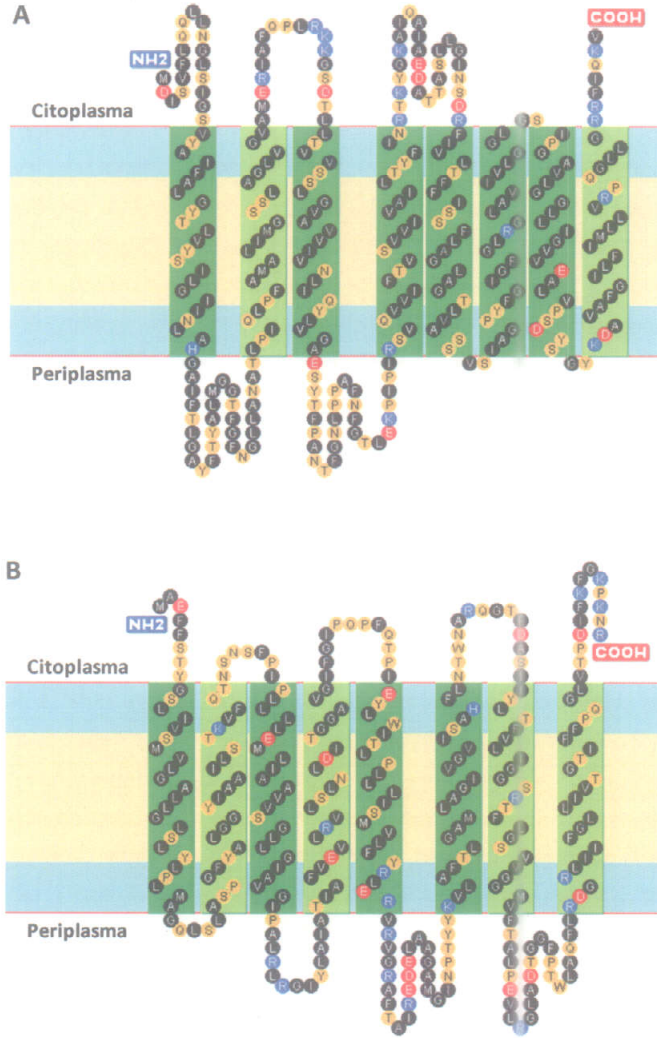


Figura 3.66. Predicción de la topología de los productos de las ORFs *alr2536* y *alr2538* de *Anabaena* sp. PCC 7120. A, topología de la proteína Alr2536. B, topología de la proteína Alr2538. En la membrana plasmática se representan en azul las regiones polares de los fosfolípidos y en ocre las cadenas hidrofóbicas. Los segmentos transmembrana se indican en verde oscuro o en verde claro según constituyan hélices α primarias o secundarias, respectivamente. En negro se muestran los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en naranja los polares, en azul los básicos y en rojo los ácidos.

La inactivación de este agrupamiento génico se abordó interrumpiendo la primera ORF del mismo, *alr2536*, que podría determinar una proteína de membrana. Para ello, se amplificó mediante PCR un fragmento interno de la misma de 552 pb, utilizando como molde DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 y los oligonucleótidos *alr2536*-7120-1 y *alr2536*-7120-2, que contienen en el extremo 5' una diana para la endonucleasa *Bam*H I (véase la Tabla 2.5 de *Materiales y Métodos* para las secuencias). El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el vector pGEM-T, generándose el plásmido pCSR4, el cual se digirió con la enzima de restricción *Bam*H I, y el fragmento resultante de *alr2536* con los extremos *Bam*H I se clonó en el vector pRL424 previamente digerido con la misma endonucleasa, obteniéndose el plásmido pCSR17 (Figura 3.67). Dicho plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose colonias resistentes a Nm, que habrían incorporado el plásmido transferido mediante recombinación simple.

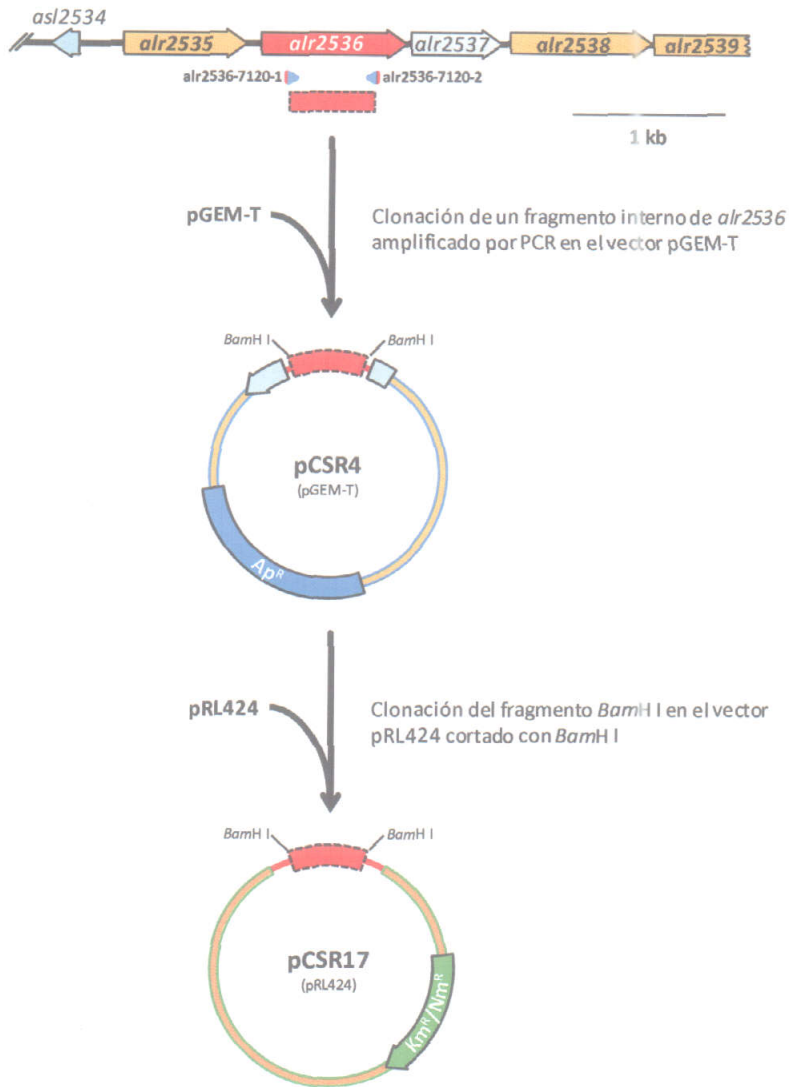


Figura 3.67. Representación esquemática de la construcción del plásmido pCSR17 para la inactivación de *alr2536*. Se señalan las dianas de restricción relevantes, los oligonucleótidos utilizados (triángulos azules con el extremo 5' en rojo para indicar la presencia de una diana de restricción *BamH I*) y, entre paréntesis, el vector del que deriva cada plásmido.

La estructura cromosómica en la región alterada se estudió mediante análisis de Southern en varios clones resultantes de la conjugación. El DNA se digirió con la enzima de restricción *Dra I* y como sonda se utilizaba el fragmento interno de *alr2536*, obtenido por restricción con *BamH I* del plásmido pCSR4, que se empleó para la generación del mutante (Figura 3.68A). En el análisis se esperaba una banda de 1,6 kb en la estirpe silvestre y de 4,7 kb en los clones que tuvieran insertado en *alr2536* el plásmido transferido (Figura 3.68B). Este análisis permitió comprobar que la inserción del plásmido se había producido correctamente interrumpiendo la ORF *alr2536* y que los cromosomas mutantes resultantes se encontraban completamente segregados, por lo que seleccionó un clon que pasó a denominarse estirpe CSR6.

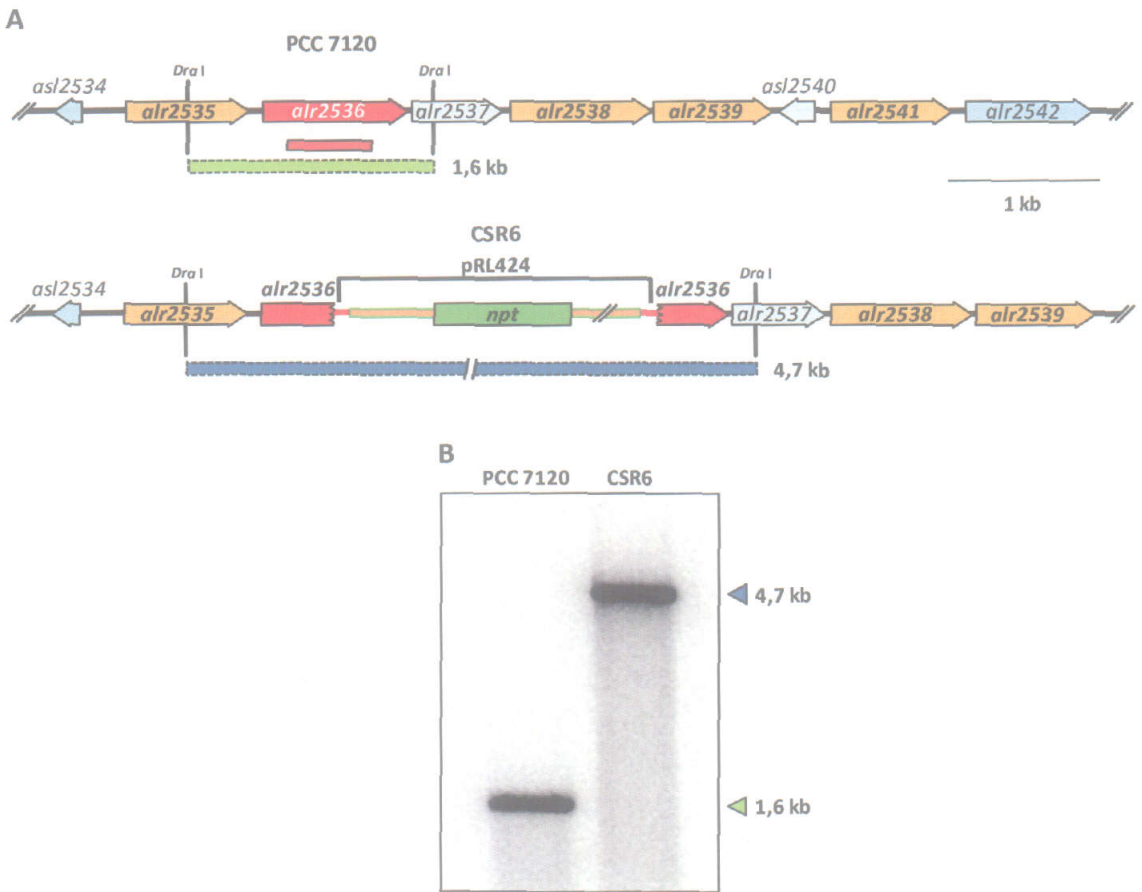


Figura 3.68. Estructura cromosómica de la estirpe CSR6 en la región de la ORF *alr2536*. A, región cromosómica que contiene la ORF *alr2536* en *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe mutante CSR6. Se indica la posición de la parte del plásmido transferido correspondiente al vector pRL424 en el genoma de la estirpe mutante, la localización de la sonda empleada (barra roja), las dianas de restricción *Dra* I y los tamaños esperados en el análisis de Southern para las bandas de las estirpes silvestre (barra verde) y CSR6 (barra azul). B, resultado del análisis de Southern de la estructura genómica del exconjugante CSR6. Se indica el tamaño de las bandas detectadas en la estirpe silvestre (triángulo verde) y mutante (triángulo azul).

Dado que el posible sistema de transporte inactivado en la estirpe CSR6 presentaba homología con la permeasa N-I, podría participar en la incorporación de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120. Por ello, se decidió ensayar la actividad de transporte de algunos aminoácidos representativos, comparando dicho mutante con la estirpe silvestre (Tabla 3.22). Los resultados obtenidos mostraban deficiencias en la actividad de transporte de algunos de los aminoácidos ensayados, especialmente Gly, Pro, Glu y Leu (Figura 3.69). Por otra parte, en el caso del aminoácido Lys se observaba una tasa de transporte ligeramente superior a la mostrada por la estirpe silvestre, aunque la diferencia no se considera significativa. Esta permeasa podría constituir un tercer sistema de transporte de aminoácidos neutros y Glu en *Anabaena* sp. PCC 7120, por lo que se decidió denominarlo sistema N-III. Cabe mencionar que este resultado fue inesperado dado que la inactivación simultánea de los sistemas de transporte N-I y N-II anula prácticamente el transporte de aminoácidos neutros y ácidos.

Tabla 3.22. Actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe mutante CSR6. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre y de la estirpe mutante CSR6 cultivadas en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso del mutante) se incubaron durante 10 min con los [14 C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μ M. Las actividades de transporte se presentan, en nmoles \cdot (mg Chl) $^{-1}\cdot$ (10 min) $^{-1}$, como la media \pm la desviación estándar de la media de los datos obtenidos en el número de ensayos que se muestra entre paréntesis. También entre paréntesis se indica la ORF inactivada en la estirpe mutante. Los ensayos de transporte de aminoácidos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles \cdot [mg Chl] $^{-1}\cdot$ [10 min] $^{-1}$)	
	PCC 7120	CSR6 (<i>alr2536</i>)
Básicos		
L-Arg	125 \pm 1,59 (25)	115 \pm 16,4 (3)
L-Lys	138 \pm 1,55 (16)	151 \pm 3,92 (2)
L-His	88,0 \pm 1,10 (16)	71,7 \pm 4,80 (3)
Ácidos		
L-Asp	37,3 \pm 0,39 (27)	33,5 \pm 2,18 (3)
L-Glu	10,5 \pm 0,12 (25)	6,62 \pm 0,70 (3)
Neutros polares		
L-Gln	99,4 \pm 0,90 (30)	77,0 \pm 6,89 (3)
L-Ser	218 \pm 2,50 (10)	195 \pm 2,05 (2)
Hidrofóbicos		
Gly	200 \pm 3,30 (15)	107 \pm 14,0 (3)
L-Ala	192 \pm 1,09 (20)	139 \pm 13,4 (3)
L-Leu	103 \pm 0,99 (17)	70,4 \pm 5,34 (3)
Aromáticos		
L-Phe	118 \pm 1,87 (16)	93,1 \pm 7,88 (3)
Únicos		
L-Pro	135 \pm 1,99 (16)	82,8 \pm 14,9 (3)

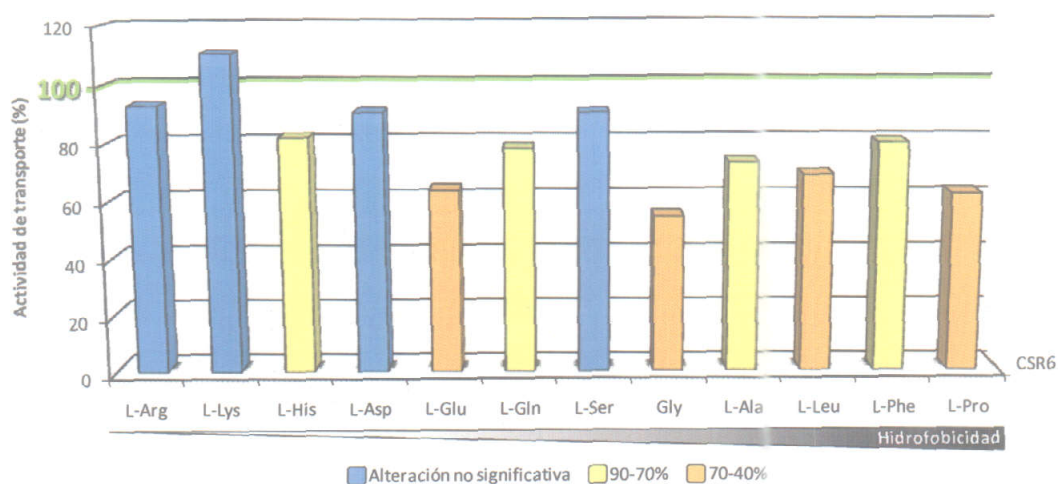


Figura 3.69. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos del mutante CSR6. Las actividades de transporte del mutante se representan como porcentajes respecto de la actividad silvestre correspondiente en la escala de colores indicada.

Dado que el sistema N-III podría ser un transportador principalmente de aminoácidos hidrofóbicos, y que los heterocistos aislados muestran una actividad apreciable de transporte de estos aminoácidos (véase la Tabla 3.13), se decidió analizar la actividad de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados del mutante CSR6 (Tabla 3.23). Los resultados obtenidos mostraron que los heterocistos aislados de este mutante tenían una tasa de transporte algo más elevada de los aminoácidos ensayados que los de la estirpe silvestre (Figura 3.70), por lo que este nuevo sistema de transporte no parece ser el responsable de la actividad de transporte de aminoácidos hidrofóbicos detectada en los heterocistos

aislados. Estos resultados serían compatibles con que el sistema inactivado representara un exportador de aminoácidos en los heterocistos.

Tabla 3.23. Actividad de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados del mutante CSR6. Filamentos enteros cultivados con gaseo de aire:CO₂ (99:1) en medio BG11₀C durante 18 h o heterocistos aislados de filamentos cultivados en las mismas condiciones se sometieron a ensayos de transporte durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican suministrados a concentración 1 μM (véase el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*). Los resultados se muestran, como la media ± la desviación estándar de la media del número de ensayos que se indica entre paréntesis, en nmoles·mg de proteína⁻¹·10 min⁻¹. Entre paréntesis se indica también el nombre de la ORF inactivada en el mutante.

Aminoácido	Actividad de transporte de aminoácidos (nmoles·mg proteína ⁻¹ ·10 min ⁻¹)		
	Filamentos	Heterocistos	
	PCC 7120	PCC 7120	CSR6 (<i>alr2536</i>)
Básicos			
L-Arg	5,73 ± 0,91 (4)	1,59 ± 0,23 (3)	3,16 (1)
L-Lys	4,63 ± 0,58 (4)	1,70 ± 0,13 (5)	2,71 ± 0,13 (3)
Ácidos			
L-Asp	0,48 ± 0,06 (4)	0,92 ± 0,03 (6)	1,13 ± 0,05 (3)
L-Glu	0,27 ± 0,02 (4)	0,78 ± 0,04 (6)	0,98 ± 0,05 (3)
Neutros polares			
L-Gln	1,65 ± 0,11 (4)	0,83 ± 0,07 (5)	1,33 ± 0,03 (3)
Hidrofóbicos			
L-Ala	3,02 ± 0,11 (4)	0,74 ± 0,02 (5)	1,39 ± 0,04 (3)
Aromáticos			
L-Phe	1,11 ± 0,07 (4)	0,30 ± 0,02 (6)	0,68 ± 0,01 (4)
Únicos			
L-Pro	1,96 ± 0,24 (4)	0,09 ± 0,01 (5)	0,12 ± 0,003 (4)

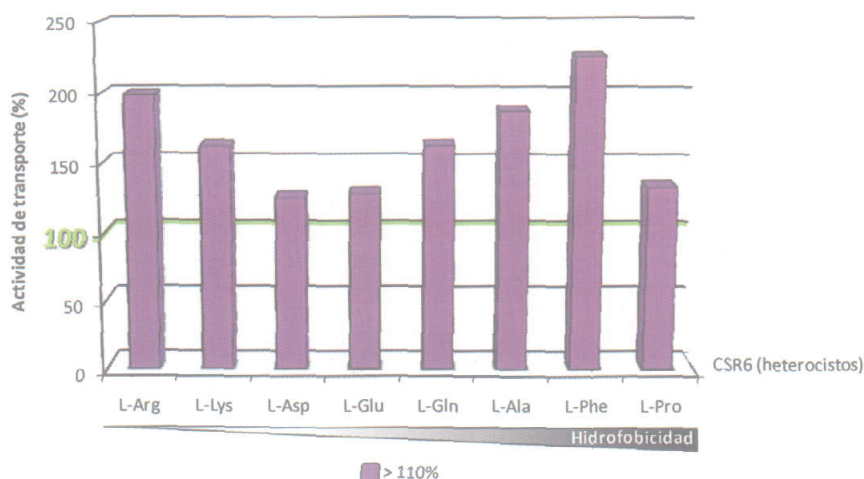


Figura 3.70. Representación esquemática de las actividades de transporte de aminoácidos en heterocistos aislados de la estirpe CSR6. Las actividades de transporte de los heterocistos del mutante se presentan en violeta como porcentajes respecto de la actividad correspondiente de los heterocistos de la estirpe silvestre.

El crecimiento de la estirpe CSR6 se estudió en medio sólido con nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado, pero no se encontraron diferencias apreciables con la estirpe silvestre (datos no mostrados). En resumen, estos resultados indican que, además de los sistemas de transporte N-I y N-II, en *Anabaena* sp. PCC 7120 el sistema N-III podría corresponder a una vía adicional de incorporación de aminoácidos en las células vegetativas, mientras que en los heterocistos podría funcionar como un exportador de aminoácidos, hipótesis que deberá ser analizada en el futuro.

3.6.4. Transporte de aminoácidos en condiciones diazotróficas.

Los ensayos de transporte de aminoácidos en filamentos enteros descritos hasta el momento en este trabajo se habían realizado utilizando cultivos incubados en medios con nitrato como fuente de nitrógeno y con aire como aporte de CO₂. A pesar de que en estudios previos no se habían observado diferencias significativas (Montesinos, 1997), cabía la posibilidad de que en condiciones de crecimiento diazotrófico pudieran expresarse otros sistemas de transporte que pudieran detectarse en los mutantes de los sistemas N-I, N-II y Bgt.

La actividad de transporte de la serie de 12 aminoácidos utilizada anteriormente se ensayó con filamentos de la estirpe silvestre y los mutantes CSX60-R8b y CSX60-R10 incubados durante 24 h en ausencia de nitrógeno combinado. En estas condiciones se aseguraba la finalización de la primera ronda de diferenciación de heterocistos. En los mutantes CSX60-R8b y CSX60-R10 no se observaron diferencias notables en estos ensayos con respecto a los realizados con filamentos cultivados con nitrato (Tabla 3.24). Estos resultados indican que, en las condiciones experimentales empleadas, no se induce ningún otro sistema que aporte una actividad de transporte de aminoácidos relevante a *Anabaena* sp. PCC 7120.

Tabla 3.24. Actividad de transporte de aminoácidos en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y los mutantes CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivados en medio BG11 e incubados o no en medio BG11₀ durante 24 h. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y los mutantes CSX60-R8b y CSX60-R10 cultivados en medio BG11 (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes), e incubados o no en medio BG11₀ durante 24 h, se sometieron a ensayos de transporte durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM, como se describe en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*. Las actividades de transporte se expresan, en nmoles·(mg Chl)⁻¹·(10 min)⁻¹, como la media ± la desviación estándar de la media del número de ensayos que se indica entre paréntesis. Para los filamentos cultivados en medio BG11 los datos son los mismos que los utilizados en la Tabla 3.6. También se indican entre paréntesis los genes inactivados en cada estirpe mutante.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·(mg Chl) ⁻¹ ·(10 min) ⁻¹)					
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120		CSX60-R8 (<i>natA natH</i>)		CSX60-R10 (<i>natA bgtA</i>)	
	BG11	BG11 ₀	BG11	BG11 ₀	BG11	BG11 ₀
Básicos						
L-Arg	125 ± 1,59 (25)	137 ± 3,75 (3)	102 ± 1,15 (16)	88,8 ± 1,41 (3)	0,45 ± 0,23 (2)	2,39 ± 0,42 (3)
L-Lys	138 ± 1,55 (16)	167 ± 3,78 (3)	121 ± 2,05 (17)	99,8 ± 1,55 (3)	0,45 ± 0,15 (4)	0,89 ± 0,17 (3)
L-His	88,0 ± 1,10 (16)	89,6 ± 4,41 (3)	56,7 ± 2,13 (9)	48,0 ± 2,37 (3)	2,20 ± 0,09 (3)	8,95 ± 2,02 (3)
Ácidos						
L-Asp	37,3 ± 0,39 (27)	33,8 ± 1,56 (3)	0,99 ± 0,04 (10)	4,33 ± 1,42 (3)	0,89 ± 0,09 (5)	2,75 ± 0,58 (3)
L-Glu	10,5 ± 0,12 (25)	17,0 ± 0,63 (3)	0,39 ± 0,05 (9)	1,53 ± 0,45 (3)	0,40 ± 0,13 (4)	0,95 ± 0,18 (3)
Neutros polares						
L-Gln	99,4 ± 0,90 (30)	119 ± 5,40 (3)	6,14 ± 0,24 (9)	7,98 ± 1,52 (3)	0,70 ± 0,07 (4)	2,70 ± 0,51 (3)
L-Ser	218 ± 2,50 (10)	280 ± 11,3 (3)	7,37 ± 0,50 (8)	3,44 ± 0,07 (3)	3,54 ± 0,50 (4)	2,24 ± 0,24 (3)
Hidrofóbicos						
Gly	200 ± 3,30 (15)	411 ± 17,1 (3)	3,98 ± 0,63 (6)	1,65 ± 0,12 (3)	1,64 ± 0,24 (4)	1,34 ± 0,15 (3)
L-Ala	192 ± 1,09 (20)	234 ± 7,73 (3)	4,16 ± 0,21 (7)	3,20 ± 0,08 (3)	1,73 ± 0,42 (4)	0,83 ± 0,02 (3)
L-Leu	103 ± 0,99 (17)	112 ± 3,40 (3)	1,24 ± 0,05 (8)	0,08 ± 0,01 (3)	0,81 ± 0,04 (4)	0,01 ± 0,01 (3)
Aromáticos						
L-Phe	118 ± 1,87 (16)	117 ± 5,80 (3)	3,22 ± 0,21 (8)	2,15 ± 0,13 (3)	1,43 ± 0,11 (4)	1,75 ± 0,09 (3)
Únicos						
L-Pro	135 ± 1,99 (16)	185 ± 7,97 (3)	1,06 ± 0,18 (7)	0,61 ± 0,09 (3)	0,97 ± 0,16 (4)	0,53 ± 0,11 (3)

Un resultado interesante de este estudio fue que en la estirpe silvestre se observaba un incremento de la actividad de transporte de algunos aminoácidos en los filamentos incubados en ausencia de nitrógeno combinado con respecto a las condiciones de crecimiento con nitrato. Los aminoácidos con una tasa de transporte más elevada eran principalmente aminoácidos neutros, destacando la Gly y, en menor medida, Pro, Ser, Ala, Gln y Leu, aunque también tenía lugar para el aminoácido ácido Glu y, de

forma menos significativa, para los aminoácidos básicos Arg y Lys. Estos resultados sugerían una cierta inducción de, al menos, los sistemas N-I y Bgt en condiciones diazotróficas.

También se llevaron a cabo ensayos de transporte con filamentos incubados con aire:CO₂ (99:1), con nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado durante 20 h, aumentando a 18 los aminoácidos ensayados en este caso (Tabla 3.25). En estas condiciones de alto aporte de CO₂ en la estirpe silvestre se observaba un nivel muy bajo de transporte de Pro y Phe (compárese con la Tabla 3.24), lo que sugería una represión del sistema N-I. Por otra parte, en ausencia de nitrógeno combinado, la inducción de los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt en la estirpe silvestre era superior a la que se observaba con filamentos incubados con aire, y afectaba a todos los aminoácidos ensayados. Además, mientras que en filamentos incubados con aire la actividad de transporte de la estirpe CSX60-R10 era muy baja para todos los aminoácidos ensayados, esta estirpe mostraba niveles apreciables de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn en condiciones de aporte adicional de CO₂. Estos resultados se corroboraron con filamentos de la estirpe mutante CSX60-R10 incubados en condiciones diazotróficas con aire:CO₂ durante 6 h, aunque las actividades de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn eran inferiores a las de los cultivos incubados durante 20 h (datos no mostrados). Así pues, estos resultados sugieren que en *Anabaena* sp. PCC 7120 en condiciones de aporte de aire:CO₂ y ausencia de nitrógeno combinado se expresa, al menos, un nuevo sistema de transporte para dichos aminoácidos.

Tabla 3.25. Actividad de transporte de aminoácidos en la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe mutante CSX60-R10 incubadas con aire:CO₂. Suspensiones celulares de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 y la mutante CSX60-R10 cultivadas en medio BG11C (suplementado con antibióticos en el caso de los mutantes) e incubadas o no en medio BG11₀C durante 20 h con suplemento de aire:CO₂ (99:1) se sometieron a ensayos de transporte durante 10 min con los [¹⁴C]aminoácidos que se indican, suministrados a concentración 10 μM de concentración, como se describe en el apartado 2.2.1 de *Materiales y Métodos*.

Aminoácido	Actividades de transporte de aminoácidos (nmoles·[mg Chl] ⁻¹ ·[10 min] ⁻¹)			
	BG11C 20 h		BG11 ₀ C 20 h	
	PCC 7120	CSX60-R10	PCC 7120	CSX60-R10
Básicos				
L-Arg	92,75	2,53	165,76	3,54
L-Lys	108,18	0,30	192,60	1,47
L-His	116,16	0,00	236,37	2,39
Ácidos				
L-Asp	35,44	15,06 ◀	64,10	105,30 ◀
L-Glu	19,11	5,60 ◀	42,56	48,14 ◀
Neutros polares				
L-Asn	59,26	1,37	178,73	30,12 ◀
L-Gln	124,90	26,45 ◀	232,16	110,21 ◀
L-Ser	126,37	1,53	241,59	3,59
L-Thr	60,97	1,20	122,35	2,65
Hidrofóbicos				
Gly	215,17	0,84	240,39	1,47
L-Ala	184,02	0,91	274,44	2,22
L-Val	65,52	0,80	125,46	1,88
L-Met	94,49	0,57	179,76	0,96
L-Ile	67,39	0,80	112,20	1,38
L-Leu	78,51	0,88	135,56	1,51
Aromáticos				
L-Tyr	21,12	0,71	45,77	1,24
L-Phe	39,33	1,55	86,00	3,30
Únicos				
L-Pro	21,82	2,23	33,91	4,01

En relación con el aminoácido Thr, en el mutante CSX60-R10 en estas condiciones se observaba una actividad de transporte ligeramente inferior a la que se observaba cuando se cultivaba en medio BG11 con aire (Tabla 3.25; véase el apartado 3.2.4). Estos resultados sugieren que los sistemas de transporte N-I y N-II podrían constituir las vías principales de incorporación de Thr en *Anabaena* sp. PCC 7120. No obstante, podrían existir sistemas adicionales que mediasen la actividad remanente de transporte de este aminoácido, al igual que para otros aminoácidos para los que aún se observan pequeñas actividades de transporte en esta estirpe.

El hallazgo de un nuevo sistema de transporte de Glu, Gln, Asp y Asn centró el interés en determinar los posibles elementos que podrían formar parte de él. Para ello, se realizaron ensayos de transporte utilizando los 18 aminoácidos ensayados en la Tabla 3.25 con filamentos de los mutantes CSR1 (*all0342*; véase el apartado 3.6.1), CSR7a (*alr3027*; véase el apartado 3.6.2) y CSR6 (*alr2536*; véase el apartado 3.6.3), incubados con aire:CO₂ (99:1) con nitrato y en ausencia de nitrógeno combinado durante 20 h. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los mutantes y la estirpe silvestre (datos no mostrados), aunque para poder descartar que ninguno de estos tres sistemas de transporte corresponda con el nuevo descubierto sería necesario inactivarlos en un fondo mutante N-I N-II Bgt.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN.

4.1. Transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120.

El objetivo que se planteó al comienzo de este trabajo fue la caracterización de los sistemas de transporte de aminoácidos en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 y la determinación de la posible implicación de los mismos en la nutrición nitrogenada del filamento en condiciones diazotróficas.

Como se comentó en el apartado 1.4 de *Introducción*, en *Anabaena* sp. PCC 7120 se habían identificado cinco sistemas diferentes de incorporación de aminoácidos en base a la alteración observada en diversos mutantes espontáneos resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos. De ellos, dos mediarían el transporte de aminoácidos neutros, siendo ambos transportadores de alta afinidad que se denominan sistemas N-I y N-II, otros dos estarían implicados en el transporte de aminoácidos básicos, siendo uno de alta afinidad, denominado sistema Bgt, y otro de baja afinidad, y el último correspondería a un sistema pasivo de aminoácidos ácidos (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003).

En este trabajo se han identificado y caracterizado tres sistemas principales de transporte de aminoácidos que son responsables de más del 98% de la actividad de transporte de dichos compuestos en *Anabaena* sp. PCC 7120 cuando ésta se cultiva con nitrato o en condiciones diazotróficas (Figura 4.1). En la Tabla 4.1 se resumen las ORFs que determinan estos transportadores, el nombre del gen correspondiente, así como los aminoácidos que son reconocidos por cada sistema de transporte. En la misma también se indica la familia a la que pertenece cada uno de estos transportadores en el sistema de clasificación TC de Busch y Saier (2002). Los resultados obtenidos han permitido interpretar algunos mutantes espontáneos resistentes a determinados análogos tóxicos de aminoácidos que se habían aislado con anterioridad (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997) como mutantes afectados en alguno de los genes identificados. Así, la estirpe mutante CS343, que definía el transportador N-I, podría portar una mutación en el gen *natE*, dado que su fenotipo de transporte de aminoácidos es muy parecido al de la estirpe mutante CSR5, y la estirpe mutante CS327 podría corresponder a un mutante *bgtA*, dado que se encuentra afectada de forma característica en el transporte de aminoácidos básicos y aspartato. Así pues, en la Tabla 4.1 no sólo se resumen los resultados de este trabajo, sino también los obtenidos en otros estudios anteriores (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003).

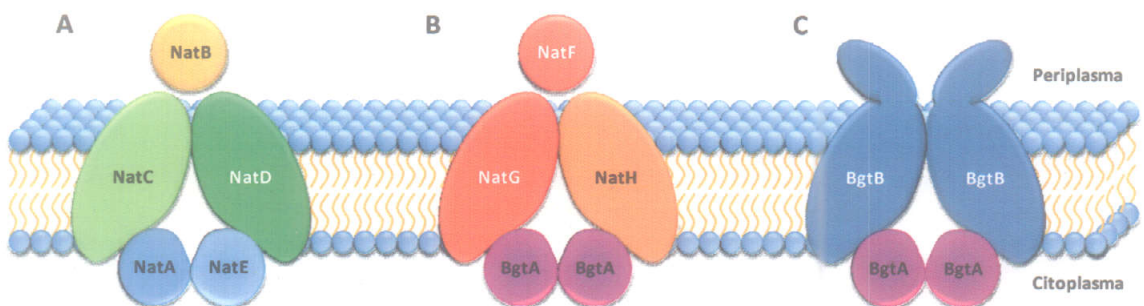


Figura 4.1. Sistemas de transporte de aminoácidos N-I, N-II y Bgt. A, transportador de aminoácidos neutros e hidrofóbicos N-I. B, transportador de aminoácidos ácidos y neutros polares N-II. C, transportador de aminoácidos básicos y Gln Bgt. Se indican las subunidades que constituyen cada sistema de transporte y el nombre de las mismas. Para el sistema Bgt, se asume una estructura de homodímeros de BgtA y BgtB.

Con respecto al sistema de transporte N-I, este grupo de investigación identificó, en trabajos anteriores, los genes *natA*, *natB* y *natC* que determinan, respectivamente, una proteína de unión de ATP, una proteína periplásmica de unión de sustrato y una proteína de membrana del mismo (Montesinos, 1997; Picossi, 2003). En este trabajo se han identificado los genes *natD* y *natE* que, según la homología que presentan sus secuencias, determinan otra proteína transmembrana y otra de unión

de ATP, respectivamente, de dicho sistema. En concordancia con los sustratos conocidos para la permeasa N-I (véanse las estirpes CSS6, CSX62 y CSX60 en la Figura 3.3 de *Resultados*) (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003), las estirpes de *Anabaena* sp. CSR11 y CSR5, que portan los genes *natD* y *natE* inactivados, respectivamente, resultaron estar muy afectadas en el transporte de Pro, Phe, Leu y Gly, mientras que la actividad de transporte de Ala y Ser se encontraba sólo parcialmente afectada (véanse las estirpes CSR11 y CSR5 en la Figura 3.12 de *Resultados*). En cuanto al transporte de His y Gln, éste estaba afectado en los mutantes *natA*, *natC*, *natD* y *natE* pero no en el mutante *natB*, que presenta una actividad de transporte de Gln significativamente más elevada que la estirpe silvestre, lo que sugiere que NatB no sea una proteína periplásmica de unión de Gln o His eficiente. Los resultados de este trabajo y estudios anteriores en los que se han realizado ensayos de competencia (Xu y McAuley, 1990; Montesinos *et al.*, 1995) indican que el sistema de transporte N-I (NatABCDE) de *Anabaena* sp. PCC 7120 reconoce todos los aminoácidos ensayados excepto Asp, siendo el principal complejo responsable del transporte de aminoácidos hidrofóbicos, entre los que se incluyen Pro, Met, Gly, aminoácidos alifáticos (Ala, Ile, Val) y aminoácidos aromáticos (Phe, Trp y Tyr), pero pudiendo también aceptar el aminoácido ácido Glu y aminoácidos neutros polares como Ser, Thr, Cys y, en menor medida, Asn, Gln e His en su forma neutra. Cabe destacar que esta permeasa constituye prácticamente la única vía de incorporación de Pro, la principal vía de incorporación de Phe, Tyr, Leu, Ile, Val, Gly y Thr y una ruta importante de entrada de Glu, Gln y Ala en esta cianobacteria.

Tabla 4.1. Sistemas de transporte de aminoácidos identificados en *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indica el número de cada familia según el sistema TC de clasificación de los transportadores (Busch y Saier, 2002, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información ampliada en <http://www.tcdb.org>). La lista de los aminoácidos reconocidos está basada en estudios de competencia con los 20 aminoácidos proteicos, mientras que la lista de los aminoácidos transportados se basa en los 18 aminoácidos que se utilizaron como sustrato en este trabajo (aminoácidos básicos: Arg, Lys, His; aminoácidos ácidos: Asp, Glu; aminoácidos neutros polares: Asn, Gln, Ser, Thr; aminoácidos hidrofóbicos: Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu; aminoácidos aromáticos: Tyr, Phe; y, además, Pro) y la ornitina, estudiada con anterioridad (Montesinos *et al.*, 1995), siempre utilizando cultivos con nitrato. Para cada permeasa, el orden en el que se presentan los aminoácidos refleja la importancia de la misma en la incorporación de dichos aminoácidos. En negrita se indican los aminoácidos que se transportan en más de un 95% a través del sistema de transporte indicado.

Transportador (familia TC)	Aminoácidos reconocidos	Aminoácidos transportados	ORF	Gen	Proteína determinada
Sistema N-I					
3.A.1.4	Pro, aminoácidos hidrofóbicos (neutros no polares y aromáticos), neutros polares y Glu	Pro, Ile, Val, Phe, Tyr, Leu, Gly, Thr, Ala, Met, Ser, Asn, His, Orn, Gln, Glu	<i>all1046</i> <i>alr1834</i> <i>all1047</i> <i>alr1284</i> <i>all2912</i>	<i>natA</i> <i>natB</i> <i>natC</i> <i>natD</i> <i>natE</i>	Subunidad ATPasa Subunidad periplásmica Subunidad transmembrana Subunidad transmembrana Subunidad ATPasa
Sistema N-II					
3.A.1.3	Aminoácidos ácidos y neutros polares, His, Val, Ala, Gly y Met	Asp, Glu, Gln, Asn, Ser, Met, Ala, His, Gly, Thr	<i>alr4164</i> <i>alr4165</i> <i>alr4166</i> <i>alr4167</i>	<i>natF</i> <i>natG</i> <i>natH</i> <i>bgtA</i>	Subunidad periplásmica Subunidad transmembrana Subunidad transmembrana Subunidad ATPasa
Sistema Bgt					
3.A.1.3	Aminoácidos básicos	Lys, Arg, Orn, His, Gln	<i>alr4167</i> <i>alr3187</i>	<i>bgtA</i> <i>bgtB</i>	Subunidad ATPasa Subunidad transmembrana y periplásmica fusionadas

En la clasificación de transportadores de Busch y Saier (2002), la permeasa N-I pertenece a la familia de transportadores de tipo ABC de aminoácidos hidrofóbicos (HAAT; TC 3.A.1.4; véanse los apartados 1.2.3.2 y 1.4 de *Introducción*), que incluye los transportadores que se recogen en la Tabla 4.2. Esta familia reúne desde permeasas con una especificidad de sustrato baja, como la permeasa Bra de *R. leguminosarum*, hasta permeasas con una especificidad más alta, como el sistema Urt. En otras cianobacterias cuyos genomas se han secuenciado, incluyendo las formadoras de heterocistos

Anabaena variabilis y *Nostoc punctiforme*, también se han encontrado genes que determinan proteínas muy similares a las que constituyen el sistema N-I.

Tabla 4.2. Sistemas de transporte reconocidos de la familia HAAT. Se indica el número asignado a cada transportador según el sistema TC de clasificación de los transportadores (Busch y Saier, 2002, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información actualizada en <http://www.tcd.org>), las subunidades que los constituyen y sus tipos, así como los organismos en los que se encuentran.

Transportador	TC	Subunidades	Organismo
Sistema LIV-I de Leu, Ile, Val, Phe y Tyr	3.A.1.4.1	LivK ^R -LivJ ^R -LivH ^T M ^T G ^C F ^C	<i>Escherichia coli</i>
Sistema Nat de aminoácidos neutros	3.A.1.4.2	NatA ^C B ^R C ^T D ^T E ^C	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Sistema general Bra _{RI} de L- y D-aminoácidos	3.A.1.4.3	BraC ^R D ^T E ^T F ^C	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Sistema Urt de urea	3.A.1.4.4	UrtA ^R B ^T C ^T D ^C E ^C	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Sistema Urt de urea, tiourea e hidroxitiourea	3.A.1.4.5	UrtA ^R B ^T C ^T D ^C E ^C	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Sistema N-I de aminoácidos neutros	3.A.1.4.6	NatA ^C B ^R C ^T D ^T E ^C	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120

R, receptor o proteína periplásmica de unión de sustrato.

T, proteína transmembrana.

C, proteína conservada o ATPasa.

En las permeasas de importación de tipo ABC, el complejo formado por los dos polipéptidos de membrana y las dos proteínas de unión de ATP puede interactuar con una o varias proteínas periplásmicas de unión de sustrato diferentes (véanse los apartados 1.1 y 1.2 de *Introducción*). Por tanto, y aunque no se puede descartar que la diferencia en la actividad de transporte de His y Gln entre el mutante *natB* y los mutantes afectados en el resto de elementos del sistema N-I se deba a mutaciones compensatorias en el mutante *natB*, el hecho de que éste tenga una capacidad de transporte de estos aminoácidos superior a la de los mutantes *natA*, *natC*, *natD* y *natE* podría deberse a la existencia de, al menos, otra proteína periplásmica de unión de sustrato implicada en el transporte de Gln e His por la permeasa N-I que funcionase más eficientemente en ausencia de NatB. De este modo, la proteína NatB reconocería Gly, Leu, Phe y Pro y, con menor afinidad, Ala y Ser, mientras que los aminoácidos Gln e His se transportarían por el sistema N-I con el concurso de otra proteína periplásmica. No obstante, esto no excluye la posibilidad de que la propia proteína NatB pueda participar en el transporte de Gln e His, aunque con baja eficiencia. Por otra parte, salvo la estirpe CSR5 (*natE*), el resto de mutantes de este sistema presenta actividades de transporte de aminoácidos ácidos más elevadas que las mostradas por la estirpe silvestre, lo que se discutirá más adelante.

Con respecto al sistema de transporte de alta afinidad de aminoácidos básicos Bgt de *Anabaena* sp. PCC 7120, en un trabajo anterior se identificó el gen *bgtB* de dicho sistema, que determina una proteína de fusión entre un componente de membrana y un componente periplásmico de un sistema de transporte de tipo ABC (Picossi, 2003). En el trabajo aquí descrito se ha identificado el gen *bgtA*, que determina una proteína de unión de ATP. De acuerdo con los sustratos conocidos de la permeasa Bgt de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Picossi, 2003), las estirpes CSS8 y CSR10, que portan los genes *bgtB* y *bgtA* inactivados, respectivamente, resultaron tener una actividad de transporte muy mermada de los aminoácidos básicos Arg y Lys, mientras que la actividad de transporte de His y Gln resultó estar afectada parcialmente. Así pues, en *Anabaena* sp. PCC 7120 el sistema de transporte Bgt (BgtAB) transporta principalmente los aminoácidos básicos Arg y Lys y, en menor medida, His y Gln.

Según la clasificación de transportadores de Busch y Saier (2002), el sistema de transporte Bgt se incluye en la familia de transportadores de tipo ABC de aminoácidos polares (PAAT; TC 3.A.1.3; véanse los apartados 1.2.3.1 y 1.4 de *Introducción*), que engloba a dos grupos de sistemas de transporte en función de si éstos son de alta o de baja especificidad de sustrato (Tabla 4.3). La permeasa Bgt de *Anabaena* sp. PCC 7120 pertenece al primer grupo de la familia PAAT, que incluye el sistema ArtPIQMJ de Arg de *E. coli* (Wissenbach *et al.*, 1995), el sistema HisJQMP de *Salmonella typhimurium*, específico de

aminoácidos básicos (His, Arg, Lys y Orn) (Higgins y Ames, 1981; Higgins *et al.*, 1982) y el sistema BgtAB de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Quintero *et al.*, 2001).

Tabla 4.3. Sistemas de transporte reconocidos de la familia PAAT. Se indica el número asignado a cada transportador según el sistema TC de clasificación de los transportadores (Busch y Saier, 2002, 2004; Saier *et al.*, 2006; Saier *et al.*, 2009, información actualizada en <http://www.tcdb.org>), las subunidades que los constituyen y sus tipos, así como los organismos en los que se encuentran.

Transportador	TC	Subunidades	Organismo
Sistemas de alta especificidad			
Sistema His de His, Arg, Lys y Orn	3.A.1.3.1	His ^R -Arg ^T -HisM ^T P ^C Q ^T	<i>Salmonella typhimurium</i>
Sistema Gln de Gln	3.A.1.3.2	GlnH ^R P ^T Q ^C	<i>Escherichia coli</i>
Sistema Art de Arg	3.A.1.3.3	Art ^R /Art ^R -ArtM ^T Q ^T P ^C	<i>Escherichia coli</i>
Sistema Glt de Glu y Asp	3.A.1.3.4	Glt ^R J ^T K ^L C	<i>Escherichia coli</i>
Sistema Occ de octopina	3.A.1.3.5	OccQ ^T M ^T P ^C T ^R	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Sistema Noc de nopalina	3.A.1.3.6	NocQ ^T M ^T P ^C T ^R	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Sistema Glu de Glu	3.A.1.3.9	GluA ^C B ^R C ^T D ^T	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Sistema Cys de cistina y diaminopimelato	3.A.1.3.10	CysX ^R Y ^T Z ^C	<i>Escherichia coli</i>
Sistema Aot de Arg y Orn	3.A.1.3.11	AotJ ^R Q ^T M ^T P ^C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sistema Bgt de Arg, Lys, His y Gln	3.A.1.3.12	BgtA ^C B ^R T	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
Sistema Ytm o Tcy de L-Cys y derivados	3.A.1.3.13	TcyJ ^R K ^R L ^T M ^T N ^C	<i>Bacillus subtilis</i>
Sistema Yck Tcy de L-Cys	3.A.1.3.14	TcyA ^R B ^T C ^C	<i>Bacillus subtilis</i>
Posible sistema de transporte de Arg	3.A.1.3.15	YqjX ^R Y ^T Z ^C	<i>Bacillus subtilis</i>
Sistema PEB1 de Glu y Asp	3.A.1.3.16	PEB1a ^R b ^T c ^C	<i>Campylobacter jejuni</i>
Sistema Bgt de aminoácidos básicos y Gln	3.A.1.3.17	BgtA ^C B ^R T	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Sistema Aat de aminoácidos ácidos	3.A.1.3.19	AatJ ^R M ^T Q ^T P ^C	<i>Pseudomonas putida</i>
Sistema Ehu de ectoína e hidroxiectoína	3.A.1.3.20	EhuA ^C B ^R C ^T D ^T	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Sistemas de baja especificidad			
Sistema Bzt de Glu, Gln, Asp y Asn	3.A.1.3.7	BztA ^R B ^T C ^T D ^C	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
Sistema general Aap de L-aminoácidos	3.A.1.3.8	AapJ ^R Q ^T M ^T P ^C	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Sistema N-II de aminoácidos ácidos y neutros	3.A.1.3.18	NatF ^R G ^T H ^T -BgtA ^C	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120

R, receptor o proteína periplásmica de unión de sustrato.

T, proteína transmembrana.

C, proteína conservada o ATPasa.

En relación al sistema de transporte N-II de *Anabaena* sp. PCC 7120, en este trabajo se han identificado los genes que determinan los elementos que lo constituyen. Estos genes se disponen en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 formando un agrupamiento con el gen *bgtA*, y se han denominado *natF*, *natG* y *natH* por analogía con los genes del sistema N-I. De los tres genes, *natF* determina una proteína periplásmica de unión de sustrato y *natG* y *natH* determinan dos proteínas de membrana que, junto con la ATPasa BgtA, constituyen el sistema de transporte N-II. Los resultados de este trabajo indican que esta permeasa (NatFGH-BgtA) reconoce y transporta principalmente los aminoácidos ácidos Asp y Glu, siendo la vía exclusiva de incorporación de Asp en esta cianobacteria, además de aminoácidos neutros polares, entre los que se incluyen Gln, Asn, Thr y Ser, aunque también puede aceptar His y los aminoácidos hidrofóbicos Ala, Gly y Met. Cabe destacar que esta permeasa y el sistema N-I constituyen las vías principales de entrada de Glu, Gln y Ala en esta cianobacteria. Así pues, la permeasa N-II ha resultado englobar las actividades de transporte de aminoácidos neutros que se habían predicho para este sistema y el transporte de aminoácidos ácidos identificado con anterioridad en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Montesinos *et al.*, 1995), por lo que esta cianobacteria no parece presentar transportadores específicos de aminoácidos ácidos.

Según la clasificación de transportadores de Busch y Saier (2002), el sistema de transporte N-II se incluye en la familia de transportadores de tipo ABC de aminoácidos polares (PAAT; TC 3.A.1.3; véanse los apartados 1.2.3.1 y 1.4 de *Introducción*), al igual que el sistema Bgt. Sin embargo, el transportador N-II pertenece al grupo de sistemas de baja especificidad de sustrato de la familia PAAT (Tabla 4.3), que incluye el transportador BztABCD de Glu, Gln, Asp y Asn de *R. capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996) y la permeasa general de aminoácidos AapJQMP de *R. leguminosarum*, que reconoce y transporta

L-aminoácidos ácidos, básicos y alifáticos (Walshaw y Poole, 1996). Desde un punto de vista estructural, un aspecto destacable de los transportadores N-II y Bgt es que comparten la subunidad ATPasa, la proteína BgtA. El hecho de que los sistemas N-II y Bgt pertenezcan a la misma familia en el sistema TC de clasificación de los transportadores refleja que son permeasas relacionadas filogenéticamente y facilita explicar que puedan presentar una subunidad ATPasa común.

La relativa gran abundancia de transportadores de la familia ABC que presentan las cianobacterias en general se ha descrito con anterioridad (Paulsen *et al.*, 2000), y este hecho probablemente refleje la importancia que tienen los tilacoides (en los que se lleva a cabo la fotosíntesis) en la bioenergética de estos organismos (Figura 4.2). La fotosíntesis es un proceso muy eficiente de producción de ATP, el cual puede ser empleado en los procesos celulares que requieren energía como el transporte de metabolitos a través de la membrana citoplasmática.

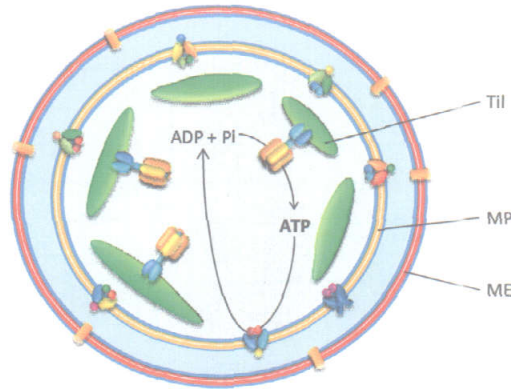


Figura 4.2. Síntesis de ATP en las cianobacterias. La producción de ATP es mediada por el complejo ATP sintasa que se localiza en los tilacoides. El ATP generado es utilizado en muchos procesos fundamentales para la célula, entre ellos, los de transporte mediado por sistemas de tipo ABC. Til, tilacoides; MP, membrana plasmática; ME, membrana externa.

En la Figura 4.3 se representa la actividad de los los tres sistemas principales de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120 para cada uno de los 20 aminoácidos proteicos. Cabe destacar la gradación de polaridad/hidrofobicidad en el reconocimiento de aminoácidos (sistema Bgt → Sistema N-II → Sistema N-I), así como el hecho de que los aminoácidos Gln e His se incorporen a través de los tres transportadores.

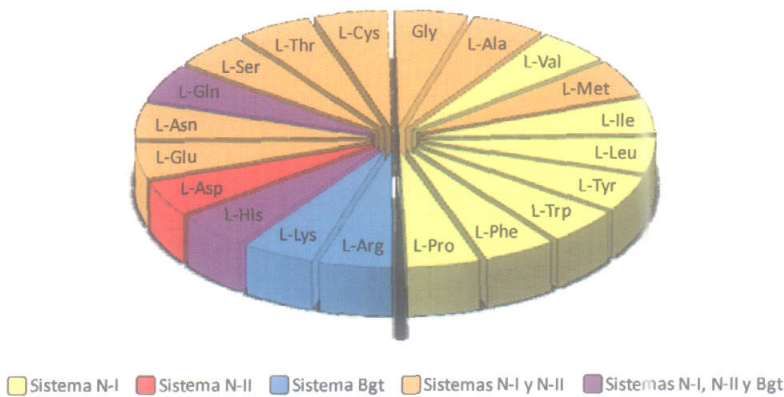


Figura 4.3. Vías de entrada de los 20 aminoácidos proteicos en *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indican los aminoácidos que se incorporan principalmente por el sistema de transporte N-I (amarillo), los que se transportan sólo a través del sistema N-II (rojo) y los que lo hacen por el sistema Bgt (azul), así como los que pueden incorporarse al interior celular por los sistemas N-I y N-II (naranja) y N-I, N-II y Bgt (violeta). Los aminoácidos están ordenados, en el sentido de las agujas del reloj, de menor a mayor hidrofobicidad desde la Arg hasta la Pro.

Un fenotipo interesante de los mutantes de algunos de los genes *nat* y *bgt* es un aumento en la actividad de transporte de determinados aminoácidos. Así, la inactivación de los genes *natF* y *natH* produce un aumento del transporte de Pro, de aminoácidos hidrofóbicos y de algunos aminoácidos polares como Gln y Ser y, en el caso del mutante *natF*, también de His, mientras que la inactivación de los genes *natB* y *natD* da lugar a un aumento en la actividad de transporte de aminoácidos ácidos y de los básicos Arg y Lys y, en el caso del mutante *natB*, también de His y Gln (Figura 4.4). Así pues, la ausencia del sistema N-II permite que tenga lugar una actividad de transporte más elevada de los sustratos del sistema N-I, mientras que la ausencia de la permeasa N-I permite una actividad de transporte más elevada de los sustratos del sistema N-II y de los sustratos del sistema Bgt. Por último, la inactivación del gen *bgtB* también produce un aumento de transporte de Pro, algunos aminoácidos hidrofóbicos y Ser (Figura 4.4), todos ellos transportados en mayor o menor proporción a través del sistema N-I. Estas observaciones sugieren algún tipo de interacción entre los elementos de los tres sistemas de transporte descritos, N-I, N-II y Bgt.

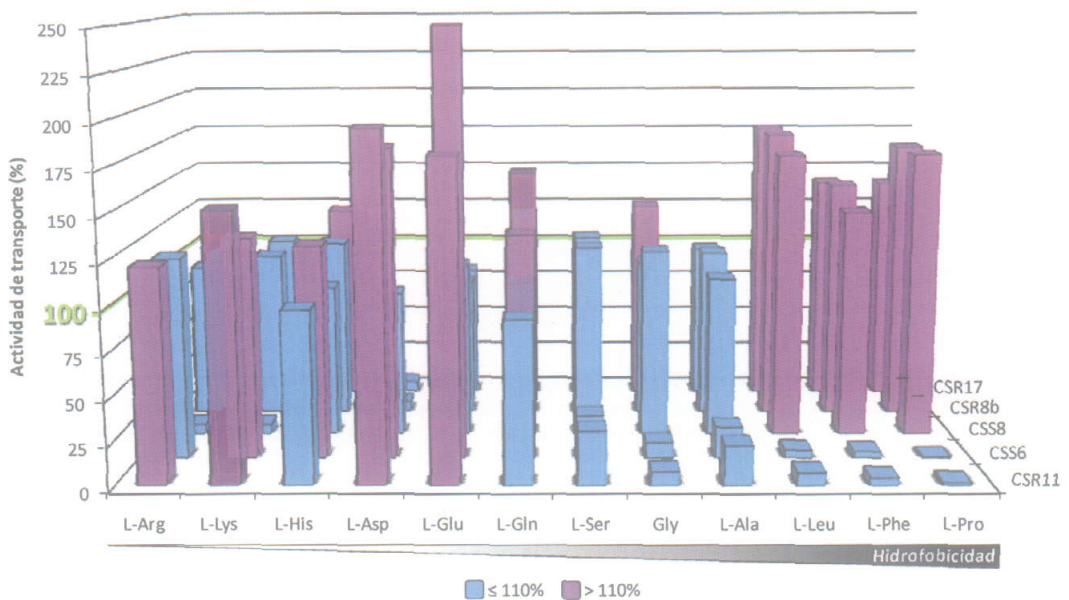


Figura 4.4. Representación esquemática de la actividad de transporte de aminoácidos de mutantes de los sistemas N-I, N-II o Bgt que presentan actividades de transporte más elevadas que la estirpe silvestre para algunos aminoácidos. La actividad de transporte de la estirpe silvestre se indica con una línea verde como el 100%, mientras que las actividades de transporte de cada estirpe mutante se muestran en azul cuando son iguales o inferiores respecto de la estirpe silvestre, o en violeta cuando son superiores a las mostradas por la estirpe silvestre. Los mutantes CSR8b y CSR17 están afectados en la proteína de membrana NatH y en la proteína periplásmica NatF, respectivamente, del sistema de transporte N-II; el mutante CSS8 está afectado en la proteína BgtB del sistema de transporte de aminoácidos básicos y los mutantes CSR11 y CSS6 están afectados en la proteína de membrana NatD y la proteína periplásmica NatB, respectivamente, del sistema N-I.

El incremento de la actividad de transporte de determinados aminoácidos al inactivar algunos genes de permeasas podría explicarse si las proteínas periplásmicas de los sistemas N-I y N-II pudieran ser reconocidas por más de un sistema de transporte. Así, el aumento en la actividad de transporte de Pro y aminoácidos hidrofóbicos que se observa en los mutantes afectados en el sistema N-II podría explicarse si la proteína periplásmica NatB del sistema N-I pudiera funcionar también con la permeasa N-II (Figura 4.5A), por lo que en ausencia del sistema N-II, NatB podría operar sin restricciones con el sistema N-I, aumentando, por tanto, la actividad de transporte de los aminoácidos incorporados a través de la permeasa N-I. Del mismo modo, la actividad de transporte más elevada de aminoácidos ácidos que tiene lugar en los mutantes del sistema de transporte N-I podría explicarse si la proteína periplásmica NatF del sistema N-II pudiera ser reconocida por la permeasa N-I (Figura 4.5B), por lo que en ausencia del sistema N-I la proteína periplásmica NatF podría operar con el sistema N-II de forma más eficiente. Por último,

cabe destacar la relación entre las actividades de transporte de aminoácidos incorporados por los sistemas N-I y Bgt. Sin embargo, la explicación del posible funcionamiento de la proteína periplásmica NatB con el sistema Bgt (Figura 4.5C), de modo que la ausencia de NatB favoreciera el transporte de aminoácidos incorporados a través de la permeasa Bgt, como Arg, Lys e His, mientras que la inactivación de la proteína BgtB produjera un incremento de la actividad de transporte de los aminoácidos que transporta el sistema N-I, es menos plausible, dada la estructura de BgtB, que es tanto una proteína de membrana como una proteína de unión de sustrato.

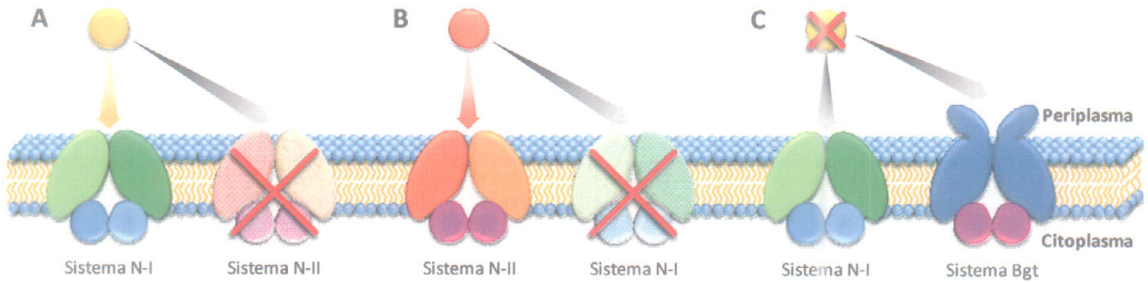


Figura 4.5. Representación esquemática de las posibles interacciones entre elementos de los sistemas N-I, N-II y Bgt. A, en ausencia del transportador N-II, la proteína periplásmica NatB (en amarillo) funcionaría exclusivamente con el sistema N-I, favoreciendo un aumento de la actividad de transporte de los aminoácidos incorporados por dicha permeasa (NatACDE). B, en ausencia de la permeasa N-I, la proteína periplásmica NatF (en rojo) interaccionaría únicamente con el sistema N-II, aumentando la actividad de dicho sistema (NatGH-BgtA). C, en ausencia de la proteína periplásmica del sistema N-I, se podría favorecer el funcionamiento de la permeasa Bgt (BgtAB).

La familia ABC de sistemas de transporte reúne tanto a sistemas de importación como de exportación, en los que una diferencia es la ausencia de proteínas periplásmicas de unión de sustrato en el segundo tipo. En general se consideraba que el movimiento de sustratos a su través tenía lugar de forma unidireccional e irreversible, siendo la proteína periplásmica de unión de sustrato la que determinaba el sentido en el que funcionaba el sistema. Sin embargo, se ha descrito que algunos transportadores de aminoácidos de tipo ABC dependientes de proteína periplásmica de unión de sustrato, como las permeasas Aap y Bra_{RI} de *Rhizobium leguminosarum* e His de *Salmonella typhimurium*, pueden mediar reacciones bidireccionales, habiéndose propuesto que sea una característica general de todos los sistemas de transporte de tipo ABC (Hosie *et al.*, 2001). La unidireccionalidad generalmente observada en este tipo de transportadores se debe a que la K_s para el sustrato es muy superior en el lado citoplásmico que en el periplásmico del transportador, debido a la mayor afinidad que presentan las proteínas periplásmicas de unión de sustrato con respecto al sitio de unión presente en las subunidades transmembrana de los complejos de transporte.

Las principales permeasas de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (N-I, N-II y Bgt) podrían operar como importadores y exportadores, aunque con preferencia por el componente de incorporación. Este comportamiento también permitiría explicar el incremento de la actividad de transporte de determinados aminoácidos al inactivar algunos genes de dichos sistemas. Así, el aumento en la actividad de transporte de Pro y aminoácidos hidrofóbicos que se observa en los mutantes afectados en el sistema N-II podría explicarse si este sistema pudiera constituir una vía de liberación de dichos aminoácidos, por lo que en su ausencia se favorecería la acumulación de los mismos. Del mismo modo, la actividad de transporte más elevada de aminoácidos ácidos y neutros polares que tiene lugar en los mutantes del sistema de transporte N-I podría explicarse si este sistema pudiera permitir la liberación de dichos aminoácidos, de modo que al inactivarlo se produjera la acumulación de los mismos. Por último, cabe destacar la relación entre las actividades de transporte de aminoácidos incorporados por los sistemas N-I y Bgt, de forma que cada uno de estos sistemas podría permitir la liberación de los aminoácidos transportados por la otra permeasa. Así pues, en ausencia de una de ellas se favorecería la

acumulación de los aminoácidos transportados por el otro sistema de transporte. No obstante, pese a que es plausible que los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt puedan funcionar como importadores y exportadores, esta explicación no es excluyente con un posible intercambio de las proteínas periplásmicas NatB y NatF, pertenecientes a los sistemas de transporte N-I y N-II, respectivamente, entre ambas permeasas.

En este trabajo se ha corroborado la expresión específica del sistema de transporte N-I en las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Picossi, 2003), y se ha determinado que esta expresión diferencial no ocurre en el caso de los sistemas N-II y Bgt. Con respecto al sistema N-I, los genes *natCA* y *natB* se expresan de forma constitutiva en las células vegetativas, independientemente de la fuente de nitrógeno que se utilice para el crecimiento, pero se produce una represión de los mismos en los heterocistos. Esta represión se había determinado analizando la expresión de los genes *nat* mediante *Northern* (Picossi, 2003), y en este trabajo se ha confirmado mediante ensayos de transporte en heterocistos aislados empleando aminoácidos característicos del sistema N-I. Por otra parte, con respecto a los sistemas de transporte N-II y Bgt, la fusión de la proteína GFP al extremo C-terminal de la ATPasa BgtA ha permitido determinar que ambos sistemas están presentes tanto en las células vegetativas como en los heterocistos, siendo constitutiva la expresión de los mismos con respecto a la fuente de nitrógeno. Hay que recordar que la proteína BgtA puede interactuar con los complejos de membrana de los sistemas de transporte N-II y Bgt, constituidos por las proteínas NatG y NatF en el primer sistema y BgtB en el segundo, lo que hace que la proteína de fusión BgtA-C-GFP permita detectar simultáneamente la localización de los dos sistemas en los filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de cada uno de ellos en mutantes carentes del otro.

Además de los sistemas de transporte de aminoácidos N-I, N-II y Bgt, que constituyen las vías principales de incorporación de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120, en este trabajo se han analizado otras permeasas que podrían estar implicadas en el transporte de aminoácidos de forma minoritaria (Tabla 4.4). De ellas, algunas se expresarían tanto en células vegetativas como en heterocistos, mientras que otras lo harían únicamente en un tipo celular. En cuanto a las permeasas del primer grupo, destaca la determinada por el agrupamiento de ORFs *alr2535-alr2536-alr2538-alr2539-alr2541*, que corresponde a un tercer sistema de transporte de aminoácidos neutros y Glu, que se ha denominado sistema N-III por analogía con los transportadores N-I y N-II y dado que es homólogo al sistema N-I. Este sistema de transporte parece incorporar Gly, Pro, Glu, Leu, Ala, Gln, Phe e His en las células vegetativas, pudiendo ser el responsable de la actividad de transporte de aminoácidos, como Thr, Ser, Tyr y pequeñas trazas de otros aminoácidos neutros, que se observa en los mutantes afectados en los sistemas N-I y N-II. Sin embargo, dado que la contribución del sistema N-III a la actividad de transporte global de *Anabaena* sp. PCC 7120 parece ser baja, para evaluar su contribución sería necesario inactivar este sistema en un mutante carente de los transportadores N-I y N-II. Cabe destacar que el análisis informático de la posible proteína periplásmica de unión de sustrato Alr2535 sugiere que podría no funcionar como tal, al carecer de un péptido señal que permita su exportación al periplasma. En este contexto, y dado que en ensayos de transporte con heterocistos aislados de un mutante del sistema N-III se observa un fenotipo de acumulación incrementada de aminoácidos (Figura 3.70), el sistema de transporte N-III podría funcionar en los heterocistos como un exportador de aminoácidos.

Tabla 4.4. Otras actividades o permeasas de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indican los aminoácidos reconocidos por cada permeasa y, en los casos conocidos, las ORFs del genoma que podrían estar implicadas en dicha actividad y las posibles proteínas que determinarían.

Transportador	Sustratos	ORF	Posible producto
Permeasas de células vegetativas			
Sistema N-III de tipo ABC: importación de aminoácidos neutros y Glu	Gly, Pro, Glu, Leu,	<i>alr2535</i>	Subunidad periplásmica de unión de sustrato (?)
	Ala, Gln, Phe, His,	<i>alr2536</i>	Subunidad transmembrana
	Thr, Ser, Tyr, trazas	<i>alr2538</i>	Subunidad transmembrana
	de algunos otros	<i>alr2539</i>	Subunidad ATPasa
	aminoácidos	<i>alr2541</i>	Subunidad ATPasa
Sistema de exportación de baja especificidad de aminoácidos	Arg, His, Glu, Gln, Gly, Ala, Leu, Pro	<i>all0342</i>	Sistema monocomponente de la familia DAACS
Sistema de transporte de baja afinidad de aminoácidos básicos	Arg, Lys, Orn		
Sistema de transporte de aminoácidos ácidos y neutros polares que se induce en células vegetativas	Asp, Glu, Asn, Gln		
Permeasas de heterocistos			
Sistema N-III de tipo ABC: exportación general de aminoácidos	Phe, Arg, Ala, Lys, Gln, Pro, Glu, Asp	<i>alr2536</i>	Subunidad transmembrana
		<i>alr2538</i>	Subunidad transmembrana
		<i>alr2539</i>	Subunidad ATPasa
		<i>alr2541</i>	Subunidad ATPasa
Sistema de transporte de aminoácidos hidrofóbicos	Ala, Phe		

En este trabajo también se ha estudiado una permeasa (All0342) de *Anabaena* sp. PCC 7120 de la familia DAACS (TC 2.A.23; véase el apartado 1.2 de *Introducción*) que parece ser un sistema de exportación de aminoácidos de baja especificidad, dado que es capaz de reconocer aminoácidos ácidos, básicos y neutros, estos últimos tanto polares como hidrofóbicos (Tabla 4.4). A diferencia de los sistemas de transporte de tipo ABC, esta permeasa es de tipo monocomponente y utilizaría un gradiente electroquímico como fuente de energía (véanse los apartados 1.1 y 1.2 de *Introducción*).

Por último, en este trabajo no se han podido identificar los elementos que pudieran determinar la permeasa de baja afinidad de aminoácidos básicos de *Anabaena* sp. PCC 7120, caracterizada fisiológicamente con anterioridad (Herrero y Flores, 1990). Sin embargo, se han podido detectar, al menos, dos nuevas actividades de transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 4.4). La primera de ellas es un transporte de los aminoácidos hidrofóbicos Ala y Phe presente en los heterocistos pero no en las células vegetativas. Aunque la actividad de transporte de cada uno de estos aminoácidos podría deberse a permeasas independientes, es probable que en la incorporación de los mismos esté implicado un único sistema de transporte, en tanto que las propiedades químicas de ambos aminoácidos son similares. La segunda actividad detectada es la incorporación de los aminoácidos ácidos Asp y Glu y los neutros polares Asn y Gln, al igual que la del transportador BztABCD de *Rhodobacter capsulatus* (Zheng y Haselkorn, 1996). El transportador correspondiente se expresaría únicamente en las células vegetativas, dado que en los heterocistos aislados de los mutantes del sistema N-II no se observa transporte de Asp, Glu y Gln. Sin embargo, aunque parece expresarse en medios con nitrato, se induce de forma notable en condiciones diazotróficas.

Los filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 fragmentados mecánicamente parecen presentar agujeros en los puntos de ruptura, por donde el espacio periplásmico podría quedar expuesto al medio externo. Esta exposición permitiría una actividad de transporte más elevada de algunos aminoácidos para los que la membrana externa constituya una barrera de permeabilidad. Este parece ser el caso de los aminoácidos para los que los filamentos de esta cianobacteria presentan una afinidad relativamente

baja, como los aminoácidos ácidos Glu y Asp, habiéndose determinado una K_s de 0,4 a 0,5 mM para el primero y de 132 μ M para el segundo; la His, que muestra una K_s de 43 μ M; la Leu, que presenta una K_s de 39 μ M, y la Gin, con una K_s de 38 μ M (Montesinos *et al.*, 1995). Sin embargo, la alteración física de esta barrera que supone la membrana externa no produce ninguna alteración de la actividad de transporte de sustratos que son incorporados con una afinidad relativamente elevada, como la Arg, para la que se presenta una K_s de 1,7 μ M (Herrero y Flores, 1990), o la urea, para la que se detecta una K_s de 0,1 μ M (Valladares *et al.*, 2002).

El efecto que la fragmentación mecánica de los filamentos produce en la actividad de transporte de Glu se ha caracterizado más a fondo, habiéndose determinado que dicha actividad consta de un componente de baja afinidad y otro de alta afinidad, este último no observado en los filamentos intactos de *Anabaena* sp. PCC 7120. El componente de alta afinidad corresponde al sistema de transporte de aminoácidos ácidos y neutros polares N-II, que se localiza tanto en células vegetativas como en heterocistos. Este componente de alta afinidad no se detecta en filamentos intactos dado que la membrana externa actuaría como una barrera para el Glu que dificultaría la detección de una actividad de transporte significativa de este aminoácido a bajas concentraciones del mismo, así como la determinación precisa de la constante de afinidad de dicha actividad. Como se ha indicado, en este trabajo se ha observado que los heterocistos aislados también muestran una actividad de transporte de los aminoácidos ácidos Asp y Glu más elevada que la observada en filamentos enteros. Este aumento podría estar relacionado con el efecto que produce la fragmentación de los filamentos, dado que en los heterocistos aislados se expresa el sistema de transporte N-II y el espacio periplásmico también podría estar aquí expuesto al medio extracelular.

Las bases moleculares de esta permeabilidad restringida de la membrana externa a Glu y a algunos otros aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 podría deberse a la ausencia en este organismo de porinas apropiadas para la incorporación de los aminoácidos afectados. De hecho, las porinas que están presentes en las cianobacterias parecen diferir de las que se encuentran en otras bacterias que se han caracterizado con detalle (Flores *et al.*, 2006). Como consecuencia de la ausencia de tales porinas, las cianobacterias también podrían presentar una pérdida reducida de los mismos metabolitos.

Las cianobacterias formadoras de heterocistos son organismos multicelulares en los que, en condiciones limitantes de nitrógeno, el crecimiento es dependiente de dos tipos celulares diferentes, las células vegetativas y los heterocistos, que intercambian metabolitos y compuestos reguladores (Xu *et al.*, 2008). Este intercambio de metabolitos podría tener lugar a través de un espacio periplásmico continuo (Flores *et al.*, 2006; Mariscal *et al.*, 2007). Una permeabilidad restringida de la membrana externa a estos metabolitos permitiría que se mantuvieran dentro del filamento, que constituiría la unidad del organismo. Así pues, en las cianobacterias formadoras de heterocistos la membrana externa parece haber evolucionado para adaptarse específicamente al carácter multicelular de estos organismos. Por ello, el estudio de la actividad de transporte de cualquier metabolito en cianobacterias formadoras de heterocistos debería hacerse considerando la posibilidad de que la actividad de algunos transportadores de la membrana plasmática podría no detectarse eficientemente en filamentos intactos.

Por último, la búsqueda de sistemas de transporte de aminoácidos que pudieran estar implicados en la incorporación de Glu en *Anabaena* sp. PCC 7120 ha conducido a la identificación de una posible permeasa de piruvato y otros ácidos carboxílicos en esta cianobacteria. Cinéticamente se ha detectado la existencia de tres componentes para el transporte de este tipo de sustratos, si bien sólo para uno de ellos se han podido identificar los elementos moleculares correspondientes. Este transportador pertenece a la familia TRAP-T (véanse los apartados 1.1 y 1.2 de *Introducción*) y estaría implicado en la incorporación con baja afinidad de piruvato, reconociendo también los 2-oxomonocarboxilatos 2-oxo-3-

metilvalerato, 2-oxoisocaproato, 2-oxoisovalerato, 2-oxovalerato y 2-oxobutirato. Los mutantes *alr3027* y *all3028*, afectados en la proteína transmembrana grande y en la proteína periplásmica de unión de sustrato del sistema, respectivamente, exhiben los otros dos componentes cinéticos de transporte de piruvato, que podrían corresponder a otros transportadores implicados en la incorporación de ácidos carboxílicos en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Figura 3.63B). Cabe destacar que los ácidos carboxílicos 2-OMV, 2-OIC, 2-OIV, 2-OV y 2-OB también podrían ser reconocidos por los sistemas adicionales no caracterizados, dado que inhiben el transporte de piruvato remanente que se observa en los mutantes afectados en las proteínas Alr3027 y All3028. Pese a que las proteínas de membrana de este sistema TRAP-T, Alr3026 y Alr3027, presentan homología con las subunidades transmembrana respectivas del transportador de glutamato Gtr de *Synechocystis* sp. PCC 6803, el hecho de que el sistema de *Anabaena* sp. PCC 7120 medie la incorporación de piruvato y posiblemente otros ácidos carboxílicos es consistente con que su proteína periplásmica de unión de sustrato, All3028, presente homología con la proteína periplásmica RRC01191 de *R. capsulatus* implicada en el transporte de este tipo de sustratos.

4.2. Implicación de las permeasas de aminoácidos en la transferencia intercelular de nitrógeno.

Una posible función fisiológica de los tres sistemas de transporte mayoritarios identificados es la incorporación de aminoácidos a las células desde el medio externo, especialmente de aquellos que puedan constituir fuentes de nitrógeno para *Anabaena* sp. PCC 7120. Este es el caso de la Arg (Herrero y Flores, 1990), la Asn, la Gln (resultados no publicados) y la Ala (véase el apartado 0). También, como se discute a continuación, los sistemas de transporte de aminoácidos podrían jugar un papel en el propio metabolismo diazotrófico de esta cianobacteria.

En las cianobacterias, es un hecho conocido que los mutantes afectados en permeasas de aminoácidos neutros liberan, de forma característica, aminoácidos hidrofóbicos al medio de cultivo (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997; Picossi, 2003). En los mutantes del sistema N-I analizados en este y otros trabajos anteriores, entre los que se encuentra la estirpe CSX60, la serie de aminoácidos que se liberan incluye Ala, Phe, Ile, Leu, Val, Pro, Met, Gly y Tyr, aminoácidos que, como ya se ha descrito, se incorporan principalmente a través de dicha permeasa, además de pequeñas cantidades del aminoácido neutro polar Thr, que se incorpora a través de los sistemas N-I y N-II (Figura 4.6). Los aminoácidos que se liberan al medio se encuentran a niveles más elevados en cultivos en condiciones diazotróficas que en aquellos que contienen nitrato (Picossi, 2003), lo que podría reflejar un mayor recambio de proteínas en ausencia de nitrógeno combinado. Por el contrario, al igual que ocurre con la estirpe silvestre, los mutantes del sistema de transporte N-II, como la estirpe CSR8b, no liberan aminoácidos al medio de cultivo en condiciones diazotróficas (Figura 4.6). Por su parte, el mutante doble CSX60-R8b, afectado en ambas permeasas, sí mantiene la tendencia de liberación de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 4.6). De hecho, dado que el sistema de transporte N-II ejerce un papel complementario en la incorporación a las células vegetativas de Ala, aminoácido que se transporta mayoritariamente a través del sistema N-I (compárense las estirpes CSX60 y CSX60-R8b en la Figura 3.3 y la Figura 3.26 de *Resultados*), el mutante doble CSX60-R8b acumula Ala (y otros aminoácidos hidrofóbicos) en el medio extracelular a niveles más elevados que el mutante CSX60 (Figura 4.6). Al igual que el mutante CSX60-R8b, el mutante doble CSX60-R10, afectado en los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt, acumula aminoácidos en el medio de cultivo a concentraciones más elevadas que la estirpe CSX60, siendo incluso ligeramente superiores a las producidas por la estirpe CSX60-R8b (Figura 4.6).

Dado que la mayor parte de los aminoácidos que se liberan son hidrofóbicos, éstos podrían perderse de las células por difusión, y una función de los sistemas de transporte N-I y N-II podría ser su reincorporación al citoplasma (Labarre *et al.*, 1987; Montesinos *et al.*, 1995, 1997; Picossi, 2003). Sin

embargo, la reciente identificación de la proteína All0342 (Figura 3.52) y del sistema N-III (Figura 3.70) como posibles exportadores sugiere la posibilidad de una exportación mediada de estos aminoácidos.

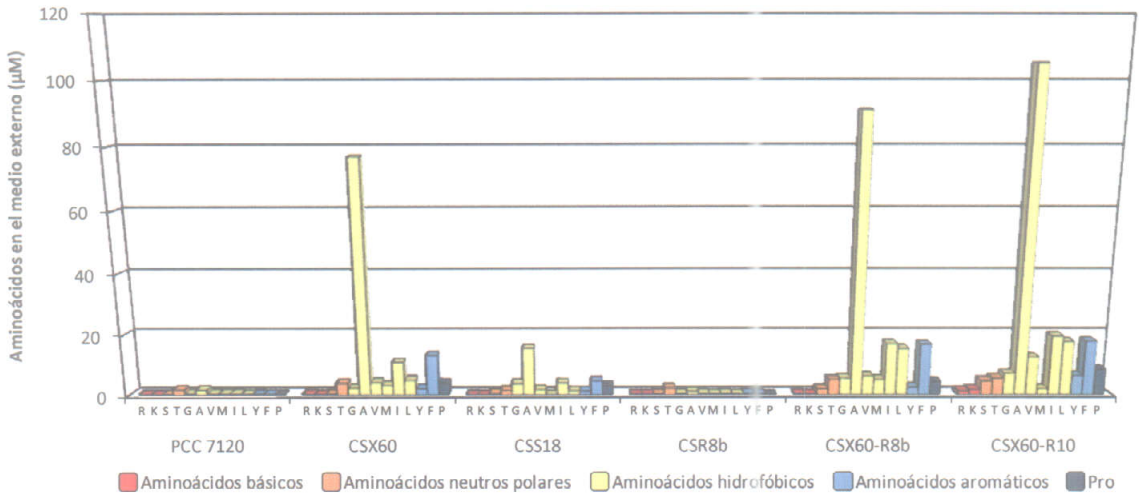


Figura 4.6. Liberación de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 y algunos mutantes de transporte de aminoácidos. Se compara la liberación de aminoácidos de mutantes representativos afectados en los sistemas N-I, N-II y/o Bgt incubados en medios carentes de nitrógeno combinado durante 48 h. Para el sistema N-I se utiliza el mutante CSX60 (*natA*), para el transportador N-II el mutante CSR8b (*natH*), para los sistemas N-I y N-II el mutante CSX60-R8b (*natA natH*) y para los sistemas N-I, N-II y Bgt el mutante CSX60-R10 (*natA bgtA*) (véase la Tabla 3.16 de Resultados). La estirpe CSS18 está afectada en el sistema N-I y además es incapaz de desarrollar heterocistos.

La liberación de Ala se afecta por la presencia de heterocistos, puesto que es menor en un mutante doble *hetR natA* (CSS18; Figura 4.6), incapaz de desarrollar heterocistos y afectado en la permeasa N-I, que en el mutante *natA*. La liberación de Ala podría resultar de dos componentes: liberación procedente de las células vegetativas, que se produciría también en células cultivadas en presencia de nitrato, y liberación procedente de los heterocistos, que no se observaría en el fondo *hetR*. En concordancia con estos resultados, en experimentos de marcaje con ^{14}C o ^{13}N se ha descrito la producción intracelular de Ala en filamentos incubados en condiciones diazotróficas de varias estirpes del género *Anabaena* (Lawrie *et al.*, 1976; Wolk *et al.*, 1976; Jüttner, 1983). En cianobacterias, la Ala puede ser el sustrato o el producto de un importante número de enzimas, entre las que destacan la alanina deshidrogenasa y algunas transaminasas (Flores y Herrero, 1994; Kaneko *et al.*, 2001). En *A. cylindrica* se ha descrito la presencia de niveles más elevados de AlaDH en heterocistos que en células vegetativas (Rowell y Stewart, 1975), y en este trabajo se han generado mutantes *ald* carentes de actividad AlaDH que muestran que esta enzima es necesaria para el crecimiento diazotrófico óptimo de *Anabaena* sp. PCC 7120. Estos resultados sugieren que la AlaDH podría contribuir, junto con la glutamina sintetasa, a la asimilación del N_2 fijado en los heterocistos.

En relación con la capacidad de crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 en condiciones diazotróficas, los distintos sistemas de transporte de aminoácidos identificados en este trabajo parecen tener grados de implicación diferentes. Por una parte, los mutantes del sistema N-I están afectados específicamente en el crecimiento en estas condiciones (véanse las estirpes CSS6 y CSX60 en la Figura 4.7), lo que indica que la capacidad de transportar algún o algunos aminoácidos que son sustratos de esta permeasa sería necesaria para un crecimiento diazotrófico óptimo. Sin embargo, la inactivación del gen *bgtB*, específico del sistema de transporte Bgt, no produce un efecto negativo en el crecimiento en condiciones diazotróficas (véase la estirpe CSS8 en la Figura 4.7), lo que indica que este sistema no es necesario para la diazotrofia. Por otra parte, aunque el efecto es inferior al que se observa al inactivar los genes del sistema N-I, la inactivación de los genes del sistema N-II (*bgtA*, *natF* o, en el mutante CSR8a, *natH*) afecta

negativamente al crecimiento diazotrófico (Figura 4.7), lo que sugiere que este transportador también contribuye a la fisiología del filamento diazotrófico. Además, se observan deficiencias más acusadas en el crecimiento diazotrófico cuando se combinan mutaciones en genes que determinan elementos de los dos sistemas, N-I y N-II, como en las estirpes CSS6-R17 y CSX60-R8b. La inactivación de los genes que determinan dos proteínas de unión de sustrato, como en la estirpe CSS6-R17, tiene menos efecto que la inactivación de los genes que determinan una ATPasa del sistema N-I y una proteína transmembrana del sistema N-II, como en la estirpe CSX60-R8b. Estos resultados sugieren que con ambos sistemas de transporte podrían funcionar proteínas de unión de sustrato adicionales. Por último, la inactivación de los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt, como en la estirpe CSX60-R10, tiene un efecto adicional poco significativo al que resulta de la inactivación de los sistemas N-I y N-II, como en la estirpe CSX60-R8b, confirmando que la permeasa Bgt no tiene un papel significativo en el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120.

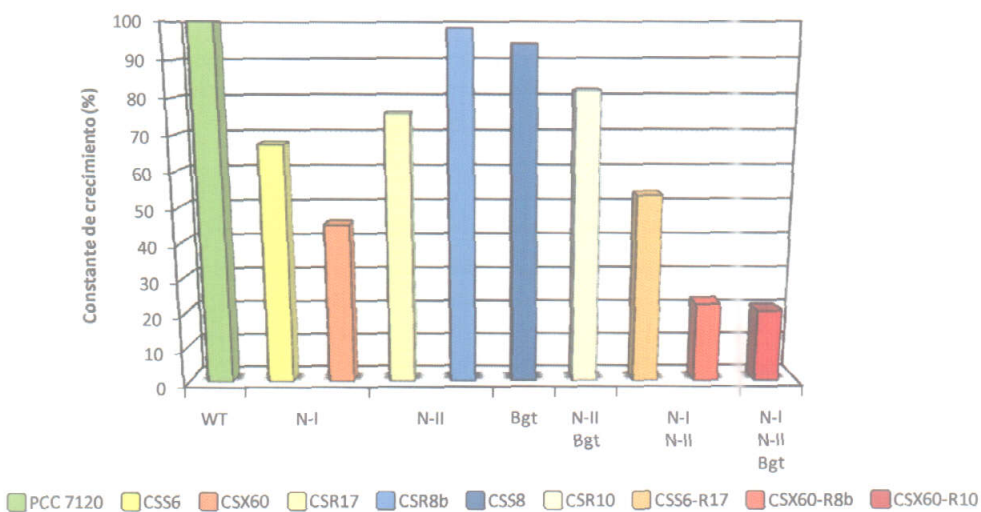


Figura 4.7. Importancia de los sistemas de transporte N-I, N-II y Bgt en el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se comparan las tasas de crecimiento en medios carentes de nitrógeno combinado de mutantes representativos afectados en algún elemento de las permeasas N-I, N-II y/o Bgt. Para el sistema N-I se utilizan los mutantes CSS6 (*natB*) y CSX60 (*natA*), para el transportador N-II los mutantes CSR17 (*natF*) y CSR8b (*natH*) y para el sistema Bgt el mutante CSS8 (*bgtB*). Se presentan también las tasas de crecimiento de las estirpes CSS6-R17 (*natB natF*), CSX60-R8b (*natA natH*) y CSX60-R10 (*natA bgtA*), afectadas en varios de estos sistemas de transporte simultáneamente. (Los datos utilizados corresponden a los presentados en la Tabla 3.14.)

Dada la amplitud de sustratos de los sistemas de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120, se hace difícil determinar cuáles podrían estar implicados en la deficiencia que se observa en el crecimiento diazotrófico en los mutantes afectados en dichos sistemas. Para intentar discernir esta cuestión, se buscó una posible correlación entre las constantes de crecimiento de los mutantes de las permeasas de aminoácidos y la actividad de transporte para algún aminoácido, o combinación de ellos, en dichos mutantes. La correlación que mejor se ajusta (R^2 , 0,846) es la que implica conjuntamente a los aminoácidos Ala y Gln (Figura 4.8), que por separado producen correlaciones con ajustes lineales de R^2 algo inferiores, de 0,812 y 0,664, respectivamente. Estos datos apoyan que la falta de actividad de transporte de Ala y Gln sea responsable de la deficiencia en el crecimiento diazotrófico que se observa en los mutantes afectados en los sistemas de transporte de aminoácidos. Sin embargo, dado que las tasas de crecimiento de los mutantes dobles CSS6-R17 (*natB natF*) y CSX60-R8b (*natA natH*) son significativamente diferentes aun presentando una actividad de transporte de Ala y Gln similar, es probable que, además de la de dichos aminoácidos, la falta de transporte de otros pueda estar relacionada también con el defecto en el crecimiento diazotrófico.

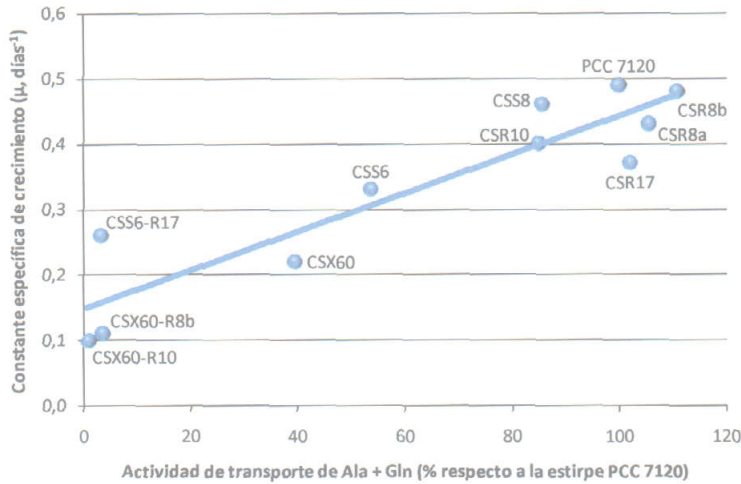


Figura 4.8. Correlación de las actividades de transporte de Ala y Gln con el crecimiento diazotrófico en mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 afectados en sistemas de transporte de aminoácidos. Se muestra la actividad de transporte conjunta de Ala y Gln de los mutantes de transporte de aminoácidos en porcentaje respecto de la estirpe silvestre, y la tasa de crecimiento (μ) de cada estirpe. Coeficiente de correlación lineal R^2 , 0,846.

Cuando se analizó una posible correlación entre las constantes de crecimiento de los mutantes de las permeasas de aminoácidos y la cantidad de alanina que pierden al medio de cultivo en condiciones diazotróficas, empleándose los datos mostrados en la Tabla 3.16 (incubaciones durante 48 h), se obtuvo una correlación lineal negativa con un valor de R^2 de 0,976 (Figura 4.9). Estos resultados sugieren que la pérdida de Ala puede ser una de las causas que influyen negativamente en la capacidad de crecimiento diazotrófico de los mutantes afectados en el transporte de este aminoácido.

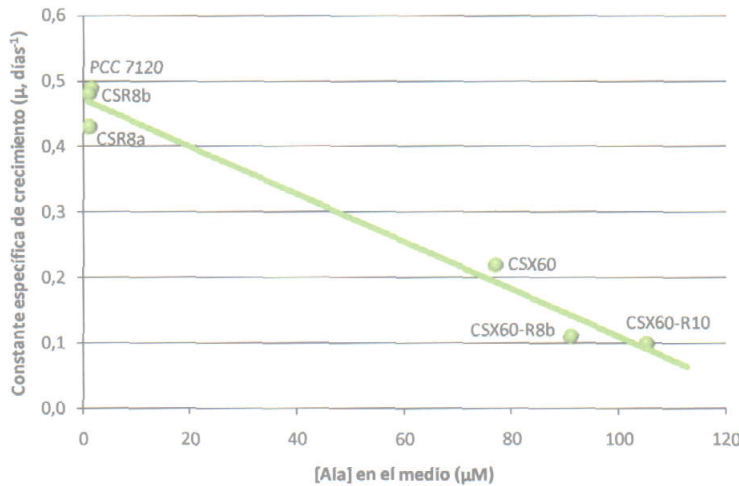


Figura 4.9. Correlación de la cantidad de Ala liberada al medio con la capacidad de crecimiento diazotrófico en mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 afectados en sistemas de transporte de aminoácidos. Se muestra la concentración de Ala presente en los medios de cultivo de los mutantes de transporte de aminoácidos incubados en ausencia de nitrógeno combinado con aire:CO₂ (99:1) durante 48 h y la tasa de crecimiento diazotrófico (μ) de cada estirpe. Coeficiente de correlación lineal R^2 , 0,976.

Por otra parte, la Gln está descrita como un vehículo para la transferencia de nitrógeno desde los heterocistos hasta las células vegetativas, mientras que el Glu se transfiere desde las segundas a los primeros (Wolk *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1977; Wolk *et al.*, 1994; Martín-Figueroa *et al.*, 2000), habiéndose demostrado que los heterocistos aislados pueden producir Gln a partir de Glu y amonio (Thomas *et al.*, 1977). El transporte de Gln está anulado en los mutantes CSS6-R17, CSX60-R8b y CSX60-

R10, afectados en el crecimiento en condiciones diazotróficas, y en este trabajo se ha demostrado que el sistema N-II es el responsable del transporte de Glu en heterocistos aislados (véase la Tabla 3.13 de *Resultados*). Sin embargo, los mutantes carentes del sistema N-II, como las estirpes CSR17 (*natF*), CSR8a (*natH*) y CSR10 (*bgtA*), sólo están ligeramente afectados en el crecimiento diazotrófico, lo que sugiere que otros transportadores o mecanismos podrían participar en la transferencia de Glu desde las células vegetativas hasta los heterocistos en los filamentos completos. En este contexto, el reciente descubrimiento de la proteína SepJ (Flores *et al.*, 2007) y su posible mediación de una transferencia directa de compuestos entre células (Mullineaux *et al.*, 2008) es de interés (Figura 4.10).

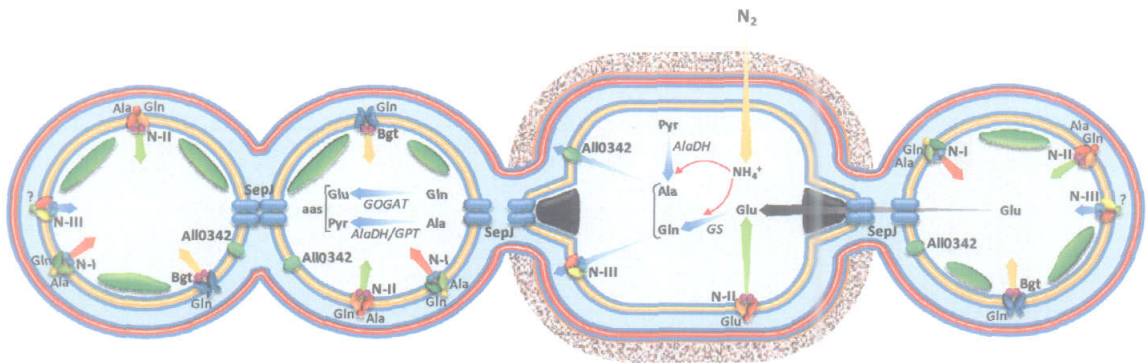


Figura 4.10. Modelo periplásmico de la transferencia de nitrógeno en el filamento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se representa un filamento de *Anabaena* con un heterocisto funcional. La cianoficina presente en el heterocisto se representa como una zona negra en los polos (gránulos polares). GOGAT, glutamato sintasa; AlaDH, alanina deshidrogenasa; GPT, glutamato-piruvato transaminasa; aas, aminoácidos. Se indican los sistemas de transporte presentes en las membranas de las células vegetativas y de los heterocistos, que participarían en la captación de los aminoácidos del espacio periplásmico o en la exportación de aminoácidos al mismo.

Los aminoácidos producidos por los heterocistos podrían transferirse al resto de las células del filamento a través de dos vías diferentes, contempladas en dos modelos propuestos que se han comentado en el apartado 1.3 de *Introducción*. Por un lado, la transferencia de compuestos nitrogenados podría tener lugar directamente célula a célula (Lang y Fay, 1971; Giddings y Staehelin, 1978, 1981). Por otro lado, se ha propuesto el denominado modelo periplásmico de transferencia de nitrógeno, que implica la exportación de aminoácidos por parte de los heterocistos al espacio periplásmico, que es física y funcionalmente continuo a lo largo del filamento (Ris y Singh, 1961; Hoiczky y Baumeister, 1995; Flores *et al.*, 2006; Mariscal *et al.*, 2007), por el que difundirían y desde el que serían recogidos por las células vegetativas mediante permeasas de aminoácidos con el concurso de proteínas de unión de sustrato (Figura 4.10) (Montesinos *et al.*, 1995; Montesinos, 1997; Picossi, 2003). En *Anabaena* sp. PCC 7120, los sistemas de transporte N-I y N-II podrían llevar a cabo esta función, pudiendo ser relevante que el sistema N-I sólo esté presente en las células vegetativas. En este contexto, es de interés el hallazgo, discutido más arriba, de que la membrana externa de *Anabaena* sp. PCC 7120 represente una barrera de permeabilidad para metabolitos importantes en la fisiología diazotrófica.

Los dos modelos de transferencia no son necesariamente excluyentes. Así, es concebible que la vía directa permita la difusión desde las células vegetativas hasta los heterocistos de un aminoácido como el Glu, que se encuentra a una concentración alta en el citoplasma de las células vegetativas de las cianobacterias, mientras que la transferencia de cantidades limitantes de aminoácidos como vehículos de nitrógeno desde los heterocistos hasta las células vegetativas podría requerir un mecanismo activo, como sería el del modelo periplásmico, que implica la participación de permeasas que median un transporte dependiente de energía.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

1. El sistema de transporte de aminoácidos N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120 es de tipo ABC y consta de al menos cinco elementos: NatA (proteína de unión de ATP), NatB (proteína periplásmica de unión de sustrato), NatC (proteína transmembrana), NatD (proteína transmembrana) y NatE (proteína de unión de ATP), estos dos últimos identificados en este trabajo. La permeasa N-I constituye la vía principal de entrada de aminoácidos hidrofóbicos (neutros no polares, aromáticos y Pro) y una vía de incorporación de aminoácidos neutros polares y el aminoácido ácido Glu en las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120.

2. El sistema de transporte de aminoácidos básicos Bgt es de tipo ABC y consta de dos elementos: BgtA (proteína de unión de ATP) y BgtB (proteína de fusión con un dominio de membrana y otro correspondiente a una proteína periplásmica de unión de sustrato). Este transportador constituye la vía principal de incorporación de aminoácidos básicos, His y, en menor proporción, Gln en filamentos enteros de esta cianobacteria, siendo responsable del transporte de aminoácidos básicos en heterocistos aislados.

3. El sistema de transporte de aminoácidos N-II es de tipo ABC y está compuesto, al menos, por cuatro elementos: NatF (proteína periplásmica de unión de sustrato), NatG (proteína transmembrana), NatH (proteína transmembrana) y BgtA (proteína de unión de ATP). Así, los sistemas de transporte Bgt y N-II comparten la subunidad de unión de ATP BgtA. El sistema N-II está implicado en el transporte de aminoácidos ácidos, neutros polares y algunos aminoácidos neutros no polares, siendo responsable del transporte de aminoácidos ácidos y Gln en heterocistos aislados.

4. Los sistemas N-I, N-II y Bgt son conjuntamente responsables de más del 98% de la actividad de transporte de aminoácidos observada en filamentos de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivados con nitrato o N₂ como fuente de nitrógeno y aire como aporte de CO₂. Sin embargo, en las células vegetativas de filamentos cultivados con mayor aporte de CO₂ se induce un transportador de Glu, Gln, Asp y Asn que aún no se ha caracterizado molecularmente. Además, esta cianobacteria presenta otros transportadores de aminoácidos, como el sistema de tipo ABC N-III (Alr2535-Alr2536-Alr2538-Alr2539-Alr2541) y la permeasa monocomponente All0342 que podrían actuar como exportadores.

5. A diferencia del sistema de transporte N-I, que es exclusivo de las células vegetativas, los sistemas N-II y Bgt se encuentran presentes tanto en células vegetativas como en heterocistos. Mientras que el sistema Bgt no es necesario para el crecimiento diazotrófico, los sistemas N-II y, sobre todo, N-I se requieren para un crecimiento diazotrófico óptimo de *Anabaena* sp. PCC 7120.

6. Los mutantes N-I y N-I N-II acumulan una cantidad sustancial de Ala en el medio de cultivo, que en parte depende de la presencia de heterocistos en los filamentos, y la velocidad de crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120 correlaciona positivamente con la capacidad de transporte de Ala y de Ala + Gln. Además de la Gln, aceptada generalmente como un posible vehículo de transferencia de nitrógeno desde los heterocistos hasta las células vegetativas, los resultados aquí obtenidos sugieren un importante papel también de la Ala en la fisiología del filamento diazotrófico. Consistentemente, la alanina deshidrogenasa se requiere para el crecimiento diazotrófico óptimo de *Anabaena* sp. PCC 7120.

7. *Anabaena* sp. PCC 7120 incorpora eficientemente piruvato mostrando tres componentes cinéticos de transporte que sugieren la presencia de varias permeasas para este sustrato en esta cianobacteria. Las ORFs *alr3026*, *alr3027* y *all3028* del genoma de la misma determinan una de estas permeasas, un transportador de tipo TRAP-T de piruvato y posiblemente otros ácidos carboxílicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

G. BIBLIOGRAFÍA.

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S., y Kaback, H.R. (2003a) The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* 555: 96-101.

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., y Iwata, S. (2003b) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301: 610-615.

Adams, D.G. (2000) Symbiotic Interactions. En *The ecology of cyanobacteria, their diversity in time and space*. Whitton, B. A. y Potts, M. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 523-561.

Adams, M.D., Wagner, L.M., Graddis, T.J., Landick, R., Antonucci, T.K., Gibson, A.L., y Oxender, D.L. (1990) Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 11436-11443.

Alchi, M., Yoshihara, S., Yamashita, M., Maeda, S., Nagai, K., y Omata, T. (2006) Characterization of the nitrate-nitrite transporter of the major facilitator superfamily (the *nrtP* gene product) from the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2682-2689.

Aldehni, M.F., Sauer, J., Spielhauer, C., Schmid, R., y Forchhammer, K. (2003) Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 185: 2582-2591.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Allen, M.M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 1-25.

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

Ames, G.F., Nikaído, K., Groarke, J., y Petithory, J. (1989) Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles. Energization by ATP. *J. Biol. Chem.* 264: 3998-4002.

Ames, G.F., y Joshi, A.K. (1990) Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J. Bacteriol.* 172: 4133-4137.

Ames, G.F., Mimura, C.S., 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.* 6: 429-446.

Andersen, A.B., Andersen, P., y Ljungqvist, L. (1992) Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 60: 2317-2323.

Antia, N.J., Harrison, P.J., y Oliveira, L. (1991) The role of organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* 30: 1-89.

Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y.N., Murdoch, G.H., North, R.A., y Amara, S.G. (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 15329-15332.

Atfield, G.N., y Morris, C.J. (1961) Analytical separations by highvoltage paper electrophoresis. Amino acids in protein hydrolysates. *Biochem. J.* 81: 606-614.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (2009) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York.

- Ayling, P.D., y Bridgeland, E.S. (1972) Methionine transport in wild-type and transport-defective mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 127-141.
- Ayling, P.D., Mojica-a, T., y Klopotoski, T. (1979) Methionine transport in *Salmonella typhimurium*: evidence for at least one low-affinity transport system. *J. Gen. Microbiol.* 114: 227-246.
- Baker, P.J., Sawa, Y., Shibata, H., Sedelnikova, S.E., y Rice, D.W. (1998) Analysis of the structure and substrate binding of *Phormidium lapideum* alanine dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5: 561-567.
- Batt, T., y Brown, D.H. (1974) The influence of inorganic nitrogen supply on amination and related reactions in the blue-green alga *Anabaena cylindrica* Lemm. *Planta* 116: 27-37.
- Bauer, C.C., Ramaswamy, K.S., Endley, S., Scappino, L.A., Golden, J.W., y Haselkorn, R. (1997) Suppression of heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120 by a cosmid carrying wild-type genes encoding enzymes for fatty acid synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 151: 23-30.
- Beale, S.I. (1994) Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrroles pigments: hemes, chlorophylls, and phycobilins. En *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 519-558
- Beckers, G., Bendt, A.K., Kramer, R., y Burkovski, A. (2004) Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186: 7645-7652.
- Bell, A.W., Buckel, S.D., Groarke, J.M., Hope, J.N., Kingsley, D.H., y Hermodson, M.A. (1986) The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 261: 7652-7658.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., y Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
- Bergman, B., Lindblad, P., y Rai, A.N. (1986) Nitrogenase in free-living and symbiotic cyanobacteria: immunoelectron microscopic localization. *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 75-78.
- Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N., y Stal, L.J. (1997) N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 35: 139-185.
- Black, K., Bulkema, W.J., y Haselkorn, R. (1995) The *hgk* gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 177: 6440-6448.
- Black, T.A., Cai, Y., y Wolk, C.P. (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* 9: 77-84.
- Black, T.A., y Wolk, C.P. (1994) Analysis of a *Het⁻* mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J. Bacteriol.* 176: 2282-2292.
- Bodyl, A., Mackiewicz, P., y Stiller, J.W. (2007) The intracellular cyanobacteria of *Paulinella chromatophora*: endosymbionts or organelles? *Trends Microbiol.* 15: 295-296.
- Böhme, H., y Haselkorn, R. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* 214: 278-285.
- Böhme, H. (1998) Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Sci.* 3: 346-351.

- Boncompagni, E., Dupont, L., Mignot, T., Osteras, M., Lambert, A., Poggi, M.C., y Le Rudulier, D. (2000) Characterization of a *Snorhizobium meliloti* ATP-binding cassette histidine transporter also involved in betaine and proline uptake. *J. Bacteriol.* 182: 3717-3725.
- Boos, W., y Lucht, J.M. (1996) Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. En *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Neidherdt, F.C., Curtis, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H.E. (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 1175-1209.
- Boudker, O., Ryan, R.M., Yernool, D., Shimamoto, K., y Gouaux, E. (2007) Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 445: 387-393.
- Boussiba, S., Dilling, W., y Gibson, J. (1984) Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J. Bacteriol.* 160: 204-210.
- Boussiba, S., y Gibson, J. (1987) Regulation of methylammonium/ammonium transport in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (PCC 7942). *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 289-293.
- Boyer, H.W., y Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Bradley, S., y Carr, N.G. (1971) The absence of a functional photosystem II in heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *J. Gen. Microbiol.* 68: xiii-xiv.
- Brechtel, C.E., y King, S.C. (1998) 4-Aminobutyrate (GABA) transporters from the amine-polyamine-choline superfamily: substrate specificity and ligand recognition profile of the 4-aminobutyrate permease from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 333 (Pt 3): 565-571.
- Brocks, J.J., Logan, G.A., Buick, R., y Summons, R.E. (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* 285: 1033-1036.
- Bryce, T.A., Welti, D., Walsby, A.E., y Nichols, B.W. (1972) Monohexose derivatives of long-chain polyhydroxyl alcohols: a novel class of glycolipid specific to heterocystous algae. *Phytochemistry* 11: 295-302.
- Buick, R. (1992) The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science* 255: 74-77.
- Buikema, W.J., y Haselkorn, R. (1991a) Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173: 1879-1885.
- Buikema, W.J., y Haselkorn, R. (1991b) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes Dev.* 5: 321-330.
- Busch, W., y Saier, M.H., Jr. (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 287-337.
- Busch, W., y Saier, M.H., Jr. (2004) The IUBMB-endorsed transporter classification system. *Mol. Biotechnol.* 27: 253-262.
- Cabrera-Martinez, R.M., Tovar-Rojo, F., Vepachedu, V.R., y Setlow, P. (2003) Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185: 2457-2464.
- Cal, Y.P., y Woik, C.P. (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172: 3138-3145.

- Callahan, S.M., y Bulkema, W.J. (2001) The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 40: 941-950.
- Campbell, E.L., Cohen, M.F., y Meeks, J.C. (1997) A polyketide-synthase-like gene is involved in the synthesis of heterocyst glycolipids in *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133. *Arch. Microbiol.* 167: 251-258.
- Cardemil, L., y Wolk, C.P. (1979) The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit. *J. Biol. Chem.* 254: 736-741.
- Carr, N.G. (1988) Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria. En *Biochemistry of the algae and cyanobacteria* (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe). Rogers, L. J. y Gallon, J. R. (eds.). Clarendon Press, Oxford. pp. 13-21.
- Carrasco, C.D., Buettner, J.A., y Golden, J.W. (1995) Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 791-795.
- Claros, M.G., y von Heijne, G. (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 685-686.
- Closs, E.I., Albritton, L.M., Kim, J.W., y Cunningham, J.M. (1993) Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 268: 7538-7544.
- Collier, J.L., Brahamsha, 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. *Microbiology* 145 (Pt 2): 447-459.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., y Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Coronil, T., y Lara, C. (1991) Amino acid levels and expression of the nitrate assimilation system in *Anacystis nidulans* cells. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 651-655.
- Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., y Merrick, M. (2002) Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* 21: 536-545.
- Crespo, J.L., García-Domínguez, M., y Florencio, F.J. (1998) Nitrogen control of the *glnN* gene that codes for GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Mol. Microbiol.* 30: 1101-1112.
- Curatti, L., Flores, E., y Salerno, G. (2002) Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.* 513: 175-178.
- Chang, A.B., Lin, R., Keith Studley, W., Tran, C.V., y Saier, M.H., Jr. (2004) Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Membr. Biol.* 21: 171-181.
- Chapman, J.S., y Meeks, J.C. (1983) Glutamine and glutamate transport by *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 156: 122-129.
- Chastain, C.J., Brusca, J.S., Ramasubramanian, T.S., Wei, T.F., y Golden, J.W. (1990) A sequence-specific DNA-binding factor (VF1) from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells binds to three adjacent sites in the *xisA* upstream region. *J. Bacteriol.* 172: 5044-5051.
- Chávez, S., y Candau, P. (1991) An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS Lett.* 285: 35-38.

- Chávez, S., Lucena, J.M., Reyes, J.C., Florencio, F.J., y Candau, P. (1999) The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. *J. Bacteriol.* 181: 808-813.
- Chen, G.Q., Cui, C., Mayer, M.L., y Gouaux, E. (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* 402: 817-821.
- Chen, J., Sharma, S., Quijcho, F.A., y Davidson, A.L. (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1525-1530.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., y Thompson, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31: 3497-3500.
- Chung, Y.J., y Saier, M.H., Jr. (2001) SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4: 237-245.
- Damerval, T., Guglielmi, G., Hournard, J., y De Marsac, N.T. (1991) Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix*: a photoregulated developmental process. *Plant Cell* 3: 191-201.
- Dassa, E., y Bouige, P. (2001) The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152: 211-229.
- Davidson, A.L., y Maloney, P.C. (2007) ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol.* 15: 448-455.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., y Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 317-364, table of contents.
- Dean, D.A., Davidson, A.L., y Nikaïdo, H. (1989) Maltose transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* is linked to ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9134-9138.
- DeFelice, L.J. (2004) Transporter structure and mechanism. *Trends Neurosci.* 27: 352-359.
- Deguchi, Y., Yamato, I., y Anraku, Y. (1990) Nucleotide sequence of *gltS*, the Na⁺/glutamate symport carrier gene of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 265: 21704-21708.
- DeRuyter, Y.S., y Fromme, P. (2008) Molecular structure of the photosynthetic apparatus. En *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Herrero, A. y Flores, E. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk. pp. 217-269.
- Dharmawardene, M.W., Haystead, A., y Stewart, W.D. (1973) Glutamine synthetase of the nitrogen-fixing alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 90: 281-295.
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., y Inouye, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67: 21-30.
- Dippel, R., y Boos, W. (2005) The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J. Bacteriol.* 187: 8322-8331.
- Donze, M., Haveman, J., y Schiereck, P. (1972) Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochim. Biophys. Acta* 256: 157-161.
- Doolittle, R.F., Johnson, M.S., Husain, I., Van Houten, B., Thomas, D.C., y Sancar, A. (1986) Domainal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins. *Nature* 323: 451-453.

Driessen, A.J., Rosen, B.P., y Konings, W.N. (2000) Diversity of transport mechanisms: common structural principles. *Trends Biochem. Sci.* 25: 397-401.

Elhai, J., y Wolk, C.P. (1988a) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167: 747-754.

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

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

Elhai, J., Veprikskiy, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Wolk, C.P. (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 1998-2005.

Elowitz, M.B., Surette, M.G., Wolf, P.E., Stock, J.B., y Leibler, S. (1999) Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 197-203.

Engelke, D.R., Krikos, A., Bruck, M.E., y Ginsburg, D. (1990) Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 191: 396-400.

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Milligan, A.J., Fennel, K., Cramer, B.S., Aubry, M.P., Berner, R.A., Novacek, M.J., y Zapol, W.M. (2005) The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* 309: 2202-2204.

Fay, P., Stewart, W.D., Walsby, A.E., y Fogg, G.E. (1968) Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae? *Nature* 220: 810-812.

Fay, P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 340-373.

Fetsch, E.E., y Davidson, A.L. (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9685-9690.

Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S., y Maldener, I. (1998) The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 27: 1193-1202.

Fiedler, G., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Maldener, I. (2001) NtcA-dependent expression of the *devBCA* operon, encoding a heterocyst-specific ATP-binding cassette transporter in *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 183: 3795-3799.

Fleming, H., y Haselkorn, R. (1974) The program of protein synthesis during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell* 3: 169-170.

Florencio, F.J., Marqués, S., y Candau, P. (1987) Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 223: 37-41.

Flores, E., y Muro-Pastor, M.I. (1988) Uptake of glutamine and glutamate by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 127-130.

Flores, E., y Muro-Pastor, A.M. (1990) Mutational and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 154: 521-527.

Flores, E., y Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 487-517.

- Flores, E., Frias, J.E., Rubio, L.M., y Herrero, A. (2005) Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83: 117-133.
- Flores, E., y Herrero, A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 164-167.
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C.P., y Maldener, I. (2006) Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends Microbiol.* 14: 439-443.
- Flores, E., Pernil, R., Muro-Pastor, A.M., Mariscal, V., Maldener, I., Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Wolk, C.P., y Herrero, A. (2007) Septum-localized protein required for filament integrity and diazotrophy in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 3884-3890.
- Fogg, G.E. (1949) Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm. II. In relation to carbon and nitrogen metabolism. *Ann. Bot.* 13: 241-259.
- Forchhammer, K. (1999) The P_{II} protein in *Synechococcus* sp. PCC 7942 senses and signals 2-oxoglutarate under ATP-replete conditions. En *The phototrophic prokaryotes*. Peschek, G., Löffelhardt, W. y Schmetterer, G. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Nueva York. pp. 549-553.
- Forchhammer, K. (2004) Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 319-333.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., y Kelly, D.J. (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.
- Fox, M.A., Karunakaran, R., Leonard, M.E., Mouhsine, B., Williams, A., East, A.K., Downie, J.A., y Poole, P.S. (2008) Characterization of the quaternary amine transporters of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol. Lett.* 287: 212-220.
- Frias, J.E., Mérida, A., Herrero, A., Martín-Nieto, J., y Flores, E. (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175: 5710-5713.
- Frias, J.E., Flores, E., y Herrero, A. (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 14: 823-832.
- Frias, J.E., Flores, E., y Herrero, A. (2000) Activation of the *Anabaena nif* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol. Microbiol.* 38: 613-625.
- Friga, G.M., y Farkas, G.L. (1981) Isolation and properties of an isocitrate dehydrogenase from *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 129: 331-334.
- Galmozzi, C.V., Fernández-Avila, M.J., Reyes, J.C., Florencio, F.J., y Muro-Pastor, M.I. (2007) The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated *in vivo* by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Mol. Microbiol.* 65: 166-179.
- Gallon, J.R. (1981) The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. *Trends Biochem. Sci.* 6: 19-23.
- Gallon, J.R. (1992) Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *New Phytol.* 122: 571-609.
- García-Domínguez, M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (1999) Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7161-7166.

- García-Domínguez, M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2000) NtcA represses transcription of *gjfA* and *gjfB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 35: 1192-1201.
- Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M., y Brinkman, F.S. (2005) PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21: 617-623.
- Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J., y Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* 257: 1653-1659.
- Giddings, T.H., y Staehelin, L.A. (1978) Plasma membrane architecture of *Anabaena cylindrica*: occurrence of microplasmodesmata and changes associated with heterocyst development and the cell cycle. *Cytobiologie* 16: 235-249.
- Giddings, T.H., y Staehelin, L.A. (1981) Observation of microplasmodesmata in both heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron microscopy. *Arch. Microbiol.* 129: 295-298.
- Gilson, E., Allioing, G., Schmidt, T., Claverys, J.P., 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.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J., y Pace, N.R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170: 3584-3592.
- Giovannoni, S.J., Wood, N., y Huss, V. (1992) Molecular phylogeny of oxygenic cells and organelles based on small-subunit ribosomal RNA sequences. En *Origin of plastids. Symbiogenesis, prochlorophytes and the origins of chloroplasts*. Lewin, R. A. (ed.). Chapman y Hall, Nueva York. pp. 159-170.
- Glazer, A.N. (1987) Phycobilisomes: assembly and attachment. En *The cyanobacteria*. Fay, P. y Van Baalen (eds.). Elsevier Science Publishers B. V., Nueva York. pp. 69-94.
- Golden, J.W., y Yoon, H.S. (1998) Heterocyst formation in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 623-629.
- Golden, J.W., y Yoon, H.S. (2003) Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 557-563.
- Goss, T.J., Schweizer, H.P., y Datta, P. (1988) Molecular characterization of the *tdc* operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 5352-5359.
- Gray, M.W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5: 294-299.
- Häger, K.P., Danneberg, G., y Bothe, H. (1983) The glutamate synthase in heterocysts of *Nostoc muscorum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 179-183.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hansel, A., Pattus, F., Jurgens, U.J., y Tadros, M.H. (1998) Cloning and characterization of the genes coding for two porins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *Biochim. Biophys. Acta* 1399: 31-39.
- Haselkorn, R., y Buikema, W.J. (1992) Nitrogen fixation in cyanobacteria. En *Biological nitrogen fixation*. Stacey, G., Burris, R. H. y Evans, H. J. (eds.). Londres, Chapman y Hall, Nueva York. pp. 166-190.

- Hayes, J.M., y Waldbauer, J.R. (2006) The carbon cycle and associated redox processes through time. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361: 931-950.
- Haystead, A., Dharmawardene, M.W.N., y Stewart, W.D.P. (1973) Ammonia assimilation in a nitrogen-fixing blue-green alga. *Pl. Sci. Letters* 1: 439-445.
- Henrikson, R.L., y Meredith, S.C. (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136: 65-74.
- Henderson, P.J. (1993) The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 708-721.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R., y Stanier, R.Y. (1979a) Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 73-85.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R., y Stanier, R.Y. (1979b) Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 63-71.
- Herrero, A., Flores, E., y Guerrero, M.G. (1981) Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. *J. Bacteriol.* 145: 175-180.
- Herrero, A., y Flores, E. (1990) Transport of basic amino acids by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 265: 3931-3935.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., y Flores, E. (2001) Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., y Flores, E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 469-487.
- Higgins, C.F., y Ames, G.F. (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, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G., y Ames, G.F. (1982) Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 298: 723-727.
- Higgins, C.F., Hyde, S.C., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Gill, D.R., y Gallagher, M.P. (1990) Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 571-592.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 67-113.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., y Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Hoare, D.S., Hoare, S.L., y Moore, R.B. (1967) The photoassimilation of organic compounds by autotrophic blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* 49: 351-370.
- Hofmann, H.J. (1976) Precambrian microflora, Belcher Islands, Canada: significance and systematics. *J. Paleontol.* 50: 1040-1073.
- Hogg, R.W., Voelker, C., y Von Carlowitz, I. (1991) Nucleotide sequence and analysis of the *mgI* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 229: 453-459.
- Holczyk, E., y Baumeister, W. (1995) Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 177: 2387-2395.

- Hoiczuk, E., y Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182: 1191-1199.
- Holland, D., y Wolk, C.P. (1990) Identification and characterization of *hetA*, a gene that acts early in the process of morphological differentiation of heterocysts. *J. Bacteriol.* 172: 3131-3137.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., y Locher, K.P. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 412-418.
- Hoshino, T., y Kageyama, M. (1980) Purification and properties of a binding protein for branched-chain amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 141: 1055-1063.
- Hoshino, T., y Kose, K. (1990) 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., Kose-Terao, K., y Sato, K. (1992) Solubilization and reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* high affinity branched-chain amino acid transport system. *J. Biol. Chem.* 267: 21313-21318.
- Hosie, A.H., Allaway, D., Jones, M.A., Walshaw, D.L., Johnston, A.W., y Poole, P.S. (2001) Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol. Microbiol.* 40: 1449-1459.
- Hosie, A.H., y Poole, P.S. (2001) Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.* 152: 259-270.
- Hosie, A.H., Allaway, D., Galloway, C.S., Dunsby, H.A., y Poole, P.S. (2002) *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J. Bacteriol.* 184: 4071-4080.
- Houchins, J.P. (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 768: 227-255.
- Hu, L.A., y King, S.C. (1998a) Functional significance of the "signature cysteine" in helix 8 of the *Escherichia coli* 4-aminobutyrate transporter from the amine-polyamine-choline superfamily. Restoration of Cys-300 to the Cys-less Gabp. *J. Biol. Chem.* 273: 20162-20167.
- Hu, L.A., y King, S.C. (1998b) Functional sensitivity of polar surfaces on transmembrane helix 8 and cytoplasmic loop 8-9 of the *Escherichia coli* GABA (4-aminobutyrate) transporter encoded by *gabP*: mutagenic analysis of a consensus amphipathic region found in transporters from bacteria to mammals. *Biochem. J.* 330 (Pt 2): 771-776.
- Huang, T.C., Lin, R.F., Chu, M.K., y Chen, H.M. (1999) Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology* 145 (Pt 3): 743-753.
- Huang, X., Dong, Y., y Zhao, J. (2004) HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4848-4853.
- Hvorup, R.N., Goetz, B.A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E., y Locher, K.P. (2007) Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* 317: 1387-1390.
- Isnard, A.D., Thomas, D., y Surdin-Kerjan, Y. (1996) The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J. Mol. Biol.* 262: 473-484.
- Itoh, N., y Morikawa, R. (1983) Crystallization and properties of L-alanine dehydrogenase from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2511-2519.

- Jack, D.L., Yang, N.M., y Saier, M.H., Jr. (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 268: 3620-3639.
- Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211: 969-970.
- Javelle, A., Thomas, G., Marini, A.M., Kramer, R., y Merrick, M. (2005) *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem. J.* 390: 215-222.
- Jiang, F., Hellman, U., Sroga, G.E., Bergman, B., y Mannervik, B. (1995) Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 270: 22882-22889.
- Jiang, F., Wisen, S., Widersten, M., Bergman, B., y Mannervik, B. (2000) Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by *in vitro* selection of DNA sequences from a random library. *J. Mol. Biol.* 301: 783-793.
- Jones, K.M., y Haselkorn, R. (2002) Newly identified cytochrome *c* oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts. *J. Bacteriol.* 184: 2491-2499.
- Jüttner, F. (1983) ¹⁴C-labeled metabolites in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena cylindrica* filaments and their presumptive function as transport vehicles of organic carbon and nitrogen. *J. Bacteriol.* 155: 628-633.
- Juncker, A.S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., y Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* 12: 1652-1662.
- Jung, H., Pirch, T., y Hilger, D. (2006) Secondary transport of amino acids in prokaryotes. *J. Membr. Biol.* 213: 119-133.
- Kadaba, N.S., Kaiser, J.T., Johnson, E., Lee, A., y Rees, D.C. (2008) The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. *Science* 321: 250-253.
- Kadner, R.J. (1974) Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117: 232-241.
- Kadner, R.J. (1977) Transport and utilization of D-methionine and other methionine sources in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 129: 207-216.
- 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 PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109-136.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M., y Tabata, S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8: 205-213; 227-253.
- Kangatharalingam, N., Prisco, J.C., y Paerl, H.W. (1992) Heterocyst envelope thickness, heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Anabaena flos-aquae*: influence of exogenous oxygen tension. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2673-2678.

- Kaplan, R.S. (2001) Structure and function of mitochondrial anion transport proteins. *J. Membr. Biol.* 179: 165-183.
- Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A., y Igarashi, K. (1997) Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272: 6318-6323.
- Kelly, D.J., y Thomas, G.H. (2001) The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 405-424.
- Kerr, J.D. (2002) Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1561: 47-64.
- Khademi, S., O'Connell, J., 3rd, Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L.J., y Stroud, R.M. (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305: 1587-1594.
- Khare, D., Oldham, M.L., Orelle, C., Davidson, A.L., y Chen, J. (2009) Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol. Cell* 33: 528-536.
- Khudiyakov, I., y Wolk, C.P. (1997) *hetC*, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 6971-6978.
- Khudiyakov, I.Y., y Golden, J.W. (2004) Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120, can be separated by mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 16040-16045.
- Kim, J., y Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 360: 553-560.
- Kirk, K., y Strange, K. (1998) Functional properties and physiological roles of organic solute channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 719-739.
- Kleiner, D. (1981) The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 639: 41-52.
- Knoll, A.H. (2008) Cyanobacteria and earth history. En *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Herrero, A. y Flores, E. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk. pp. 1-19.
- Kopp, R.E., Kirschvink, J.L., Hilburn, I.A., y Nash, C.Z. (2005) The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11131-11136.
- Krehenbrink, M., Oppermann-Sanio, F.B., y Steinbuchel, A. (2002) Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for occurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophycin synthetase from *Acinetobacter* sp. strain DSM 587. *Arch. Microbiol.* 177: 371-380.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., y Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305: 567-580.
- Kuan, J., y Saier, M.H., Jr. (1993a) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 209-233.
- Kuan, J., y Saier, M.H., Jr. (1993b) Expansion of the mitochondrial carrier family. *Res. Microbiol.* 144: 671-672.

- Kuroda, M., Dey, S., Sanders, O.I., y Rosen, B.P. (1997) Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 326-331.
- 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.
- Lahmi, R., Sendersky, E., Pereiman, A., Hagemann, M., Forchhammer, K., y Schwarz, R. (2006) Alanine dehydrogenase activity is required for adequate progression of phycobilisome degradation during nitrogen starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.* 188: 5258-5265.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., y Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3: 923-936.
- Lang, N.J. (1965) Electron microscopic study of heterocyst development in *Anabaena azollae* Strasburger. *J. Phycol.* 1: 127-134.
- Lang, N.J., y Fay, P. (1971) The heterocysts of blue-green algae II. Details of ultrastructure. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 178: 193-203.
- Laurent, S., Chen, H., Bedu, S., Ziarelli, F., Peng, L., y Zhang, C.C. (2005) Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 9907-9912.
- Lee, S., Lee, B., Jang, I., Kim, S., y Bhak, J. (2006) Localizome: a server for identifying transmembrane topologies and TM helices of eukaryotic proteins utilizing domain information. *Nucleic Acids Res.* 34: W99-103.
- Lee, S.J., Bohm, A., Krug, M., y Boos, W. (2007) The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. *Trends Microbiol.* 15: 389-397.
- Li, J.H., Laurent, S., Konde, V., Bedu, S., y Zhang, C.C. (2003) An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* 149: 3257-3263.
- Linton, K.J., y Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 28: 5-13.
- Locher, K.P., Lee, A.T., y Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296: 1091-1098.
- Löffelhardt, W., y Bohnert, H.J. (1994) Structure and function of the cyanelle genome. *Int. Rev. Cytol.* 151: 29-65.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, G., Westbrook, J.M., Davidson, A.L., y Chen, J. (2005) ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17969-17974.
- Ludewig, U., Wilken, S., Wu, B., Jost, W., Obrdlik, P., El Bakkoury, M., Marini, A.M., Andre, B., Hamacher, T., Boles, E., von Wiren, N., y Frommer, W.B. (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄⁺ uniporters. *J. Biol. Chem.* 278: 45603-45610.
- Ludewig, U. (2006) Ion transport versus gas conduction: function of AMT/Rh-type proteins. *Transfus. Clin. Biol.* 13: 111-116.

- Luque, I., Flores, E., y Herrero, A. (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* 13: 2862-2869.
- Luque, I., Zabulon, G., Contreras, A., y Houmard, J. (2001) Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nbIA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 41: 937-947.
- Luque, I., Vazquez-Bermudez, M.F., Paz-Yepes, J., Flores, E., y Herrero, A. (2004) *In vivo* activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.* 236: 47-52.
- Luque, I., y Forchhammer, K. (2008) Nitrogen assimilation and C/N balance sensing. En *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Herrero, A. y Flores, E. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk. pp. 335-382.
- Mackerras, A.H., de Chazal, N.M., y Smith, G.D. (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.
- Maeda, S., Okamura, M., Kobayashi, M., y Omata, T. (1998) Nitrite-specific active transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 180: 6761-6763.
- Maeda, S.I., y Omata, T. (2009) Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Bacteriol.*
- Maloney, P.C., y Wilson, T.H. (1996) Ion-coupled transport and transporters. En *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Neidherdt, F.C., Curtis, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (eds). American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 1130-1148.
- Marger, M.D., y Saier, M.H., Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20.
- Marini, A.M., Vissers, S., Urrestarazu, A., y Andre, B. (1994) Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 13: 3456-3463.
- Marini, A.M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., y Andre, B. (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4282-4293.
- Marini, A.M., Springael, J.Y., Frommer, W.B., y Andre, B. (2000) Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol. Microbiol.* 35: 378-385.
- Mariscal, V., Herrero, A., y Flores, E. (2007) Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol. Microbiol.* 65: 1139-1145.
- Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
- Marqués, S., Florencio, F.J., y Candau, P. (1992) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* 206: 69-77.
- Martín-Figueroa, E., Navarro, F., y Florencio, F.J. (2000) The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* 476: 282-286.

- Matsubara, K., Ohnishi, K., y Kiritani, K. (1992) Nucleotide sequences and characterization of *liv* genes encoding components of the high-affinity branched-chain amino acid transport system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biochem.* 112: 93-101.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., y Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404-405.
- Meeks, J.C., Wolk, C.P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P.W., Austin, S.M., Chien, W.S., y Galonsky, A. (1977) The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252: 7894-7900.
- Meeks, J.C., Wolk, C.P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P.W., y Chien, W.S. (1978) Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134: 125-130.
- Meeks, J.C., y Elhai, J. (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 94-121; table of contents.
- Mérida, A., Candau, P., y Florencio, F.J. (1991) Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J. Bacteriol.* 173: 4095-4100.
- Merrick, M.J., y Edwards, R.A. (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 604-622.
- Mimmack, M.L., Gallagher, M.P., Pearce, S.R., Hyde, S.C., Booth, I.R., y Higgins, C.F. (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8257-8261.
- Misra, H.S., y Tull, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol.* 122: 731-736.
- Mitaku, S., Hirokawa, T., y Ono, M. (1998) Classification of membrane proteins by types of transmembrane helices using SOSUI system. *Genome Informatics* 9: 367-368.
- Mitchell, P. (1957) A general theory of membrane transport from studies of bacteria. *Nature* 180: 134-136.
- Mobley, H.L., Island, M.D., y Hausinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.
- Montesinos, M.L., 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, M.L. (1997) Sistemas de transporte de aminoácidos, amonio y urea en cianobacterias. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Montesinos, M.L., 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, M.L., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., y Flores, E. (1998) Ammonium/methylammonium permeases of a cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 273: 31463-31470.

- Moslavac, S., Nicolaisen, K., Mirus, O., Al Dehni, F., Pernil, R., Flores, E., Maldener, I., y Schlieff, E. (2007) A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 7887-7895.
- 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.
- Mulkidjanian, A.Y., Koonin, E.V., Makarova, K.S., Mekhedov, S.L., Sorokin, A., Wolf, Y.I., Dufresne, A., Partensky, F., Burd, H., Kaznadzey, D., Haselkorn, R., y Galperin, M.Y. (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 13126-13131.
- Mulligan, C., Kelly, D.J., y Thomas, G.H. (2007) Tripartite ATP-independent periplasmic transporters: application of a relational database for genome-wide analysis of transporter gene frequency and organization. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 218-226.
- Mullineaux, C.W., Nenninger, A., Ray, N., y Robinson, C. (2006) Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188: 3442-3448.
- Mullineaux, C.W., Mariscal, V., Nenninger, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E., y Adams, D.G. (2008) Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *EMBO J.* 27: 1299-1308.
- Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., Flores, E., y Herrero, A. (1999) The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *J. Bacteriol.* 181: 6664-6669.
- Muro-Pastor, A.M., Valladares, A., Flores, E., y Herrero, A. (2002) Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol. Microbiol.* 44: 1377-1385.
- Muro-Pastor, M.I., y Florencio, F.J. (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 203: 99-105.
- Muro-Pastor, M.I., y Florencio, F.J. (1994) NADP⁺-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J. Bacteriol.* 176: 2718-2726.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (1996) The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178: 4070-4076.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* 276: 38320-38328.
- Muro-Pastor, M.I., Barrera, F.N., Reyes, J.C., Florencio, F.J., y Neira, J.L. (2003) The inactivating factor of glutamine synthetase, IF7, is a "natively unfolded" protein. *Protein Sci.* 12: 1443-1454.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83: 135-150.
- Murray, N.E., Brammar, W.J., y Murray, K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-61.
- Murry, M.A., Olafsen, A.G., y Benemann, J.R. (1981) Oxidation of diaminobenzidine in the heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Curr. Microbiol.* 6: 201-206.
- Murry, M.A., Hallenbeck, P.C., y Benemann, J.R. (1984) Immunochemical evidence that nitrogenase is restricted to the heterocysts in *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 137: 194-199.

- Murry, M.A., y Wolk, C.P. (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Arch. Microbiol.* 151: 469-474.
- Navarro, F., Chávez, S., Candau, P., y Florencio, F.J. (1995) Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. *Plant Mol. Biol.* 27: 753-767.
- Neilson, A.H., y Doudoroff, M. (1973) Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 89: 15-22.
- Neilson, A.H., y Larsson, T. (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* 48: 542-553.
- Neuhäuser, B., Dynowski, M., Mayer, M., y Ludewig, U. (2007) Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol.* 143: 1651-1659.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., y von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- Nikaido, H., y Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656.
- Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., y Frommer, W.B. (1994) Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.* 13: 3464-3471.
- Ogawa, W., Kim, Y.M., Mizushima, T., y Tsuchiya, T. (1998) Cloning and expression of the gene for the Na^+ -coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J. Bacteriol.* 180: 6749-6752.
- Ohshima, T., y Soda, K. (1990) Biochemistry and biotechnology of amino acid dehydrogenases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 42: 187-209.
- Ogihara, H., Matsumura, T., Fujita, Y., y Hase, T. (1999) Cloning and inactivation of genes encoding ferredoxin- and NADH-dependent glutamate synthases in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Imbalances in nitrogen and carbon assimilations caused by deficiency of the ferredoxin-dependent enzyme. *Plant Physiol.* 120: 33-42.
- Oldham, M.L., Khare, D., Quijcho, F.A., Davidson, A.L., y Chen, J. (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* 450: 515-521.
- Oldham, M.L., Davidson, A.L., y Chen, J. (2008) Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 726-733.
- Olmedo-Verd, E., Flores, E., Herrero, A., y Muro-Pastor, A.M. (2005) HetR-dependent and -independent expression of heterocyst-related genes in an *Anabaena* strain overproducing the NtcA transcription factor. *J. Bacteriol.* 187: 1985-1991.
- Olmedo-Verd, E., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Herrero, A. (2006) Localized induction of the *ntcA* regulatory gene in developing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 188: 6694-6699.
- Orelle, C., Ayvaz, T., Everly, R.M., Klug, C.S., y Davidson, A.L. (2008) Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 12837-12842.

- Orr, J., y Haselkorn, R. (1981) Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 256: 13099-13104.
- Osakai, T., Kakutani, T., y Senda, M. (1987) A novel amperometric ammonia sensor. *Anal. Sci.* 3: 521-526.
- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., y Zorzano, A. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78: 969-1054.
- Palinska, K.A., Jahns, T., Rippka, R., y Tandeau De Marsac, N. (2000) *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology* 146 Pt 12: 3099-3107.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., y Saier, M.H., Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- Patzlaff, J.S., van der Heide, T., y Poolman, B. (2003) The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J. Biol. Chem.* 278: 29546-29551.
- Paulsen, I.T., Nguyen, L., Sliwinski, M.K., Rabus, R., y Saier, M.H., Jr. (2000) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* 301: 75-100.
- Payne, G.M., Spudich, E.N., y Ames, G.F. (1985) A mutational hot-spot in the *hisM* gene of the histidine transport operon in *Salmonella typhimurium* is due to deletion of repeated sequences and results in an altered specificity of transport. *Mol. Gen. Genet.* 200: 493-496.
- Paz-Yepes, J., Herrero, A., y Flores, E. (2007) The NtcA-regulated *amtB* gene is necessary for full methylammonium uptake activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Bacteriol.* 189: 7791-7798.
- Paz-Yepes, J., Merino-Puerto, V., Herrero, A., y Flores, E. (2008) The *amt* gene cluster of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 190: 6534-6539.
- Pearce, J., Leach, C.K., y Carr, N.G. (1969) The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 55: 371-378.
- Pearson, W.R., y Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448.
- Peterson, R.B., Dolan, E., Calvert, H.E., y Ke, B. (1981) Energy transfer from phycobiliproteins to photosystem I in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 634: 237-248.
- Picossi, S. (2003) Transferencia intercelular de nitrógeno en la cianobacteria formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Picossi, S., Montesinos, M.L., Pernil, R., Lichtle, C., Herrero, A., y Flores, E. (2005) ABC-type neutral amino acid permease N-I is required for optimal diazotrophic growth and is repressed in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 57: 1582-1592.
- Pinkett, H.W., Lee, A.T., Lum, P., Locher, K.P., y Rees, D.C. (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* 315: 373-377.
- Prakash, S., Cooper, G., Singhi, S., y Saier, M.H., Jr. (2003) The ion transporter superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1618: 79-92.

Quintero, M.J. (2000) Transportadores de aminoácidos y catabolismo de arginina y prolina en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.

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., Montesinos, M.L., Herrero, A., y Flores, E. (2001) Identification of genes encoding amino acid permeases by inactivation of selected ORFs from the *Synechocystis* genomic sequence. *Genome Res.* 11: 2034-2040.

Qulocho, F.A. (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; discussion 351-342.

Qulocho, F.A., y Ledvina, P.S. (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* 20: 17-25.

Rabus, R., Jack, D.L., Kelly, D.J., y Saier, M.H., Jr. (1999) TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology* 145 (Pt 12): 3431-3445.

Rahmanian, M., Claus, D.R., y Oxender, D.L. (1973) Multiplicity of leucine transport systems in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 116: 1258-1266.

Rai, A.N., Rowell, P., y Stewart, W.D.P. (1984) Evidence for an ammonium transport system in free-living and symbiotic cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 137: 241-246.

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

Rasmussen, B., Fletcher, I.R., Brocks, J.J., y Kilburn, M.R. (2008) Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455: 1101-1104.

Rawat, S.R., Sillim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., y Glass, A.D. (1999) *AtAMT1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J.* 19: 143-152.

Reade, J.P., Dougherty, L.J., Rogers, L.J., y Gallon, J.R. (1999) Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiology* 145 (Pt 7): 1749-1758.

Reizer, J., Finley, K., Kakuda, D., MacLeod, C.L., Reizer, A., y Saier, M.H., Jr. (1993) Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. *Protein Sci.* 2: 20-30.

Reizer, J., Michotey, V., Reizer, A., y Saier, M.H., Jr. (1994) Novel phosphotransferase system genes revealed by bacterial genome analysis: unique, putative fructose- and glucoside-specific systems. *Protein Sci.* 3: 440-450.

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

Reyes, J.C., Muro-Pastor, M.I., y Florencio, F.J. (1997) Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.* 179: 2678-2689.

- Ribbe, M., Gadkarí, D., y Meyer, O. (1997) N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272: 26627-26633.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., y Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Ris, H., y Singh, R.N. (1961) Electron microscope studies on blue-green algae. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 63-80.
- Robbins, J.C., y Oxender, D.L. (1973) Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 116: 12-18.
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I., y Babaszalk, L.J. (1975) Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. En *The proteins*. P. D., Boyer (ed.). Academic Press, Nueva York. pp. 62-103.
- Rowell, P., y Stewart, W.D. (1975) Alanine dehydrogenase of the N₂-fixing blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 107: 115-124.
- Rubio, L.M., y Ludden, P.W. (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* 187: 405-414.
- Rubio, L.M., y Ludden, P.W. (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 93-111.
- Saier, M.H., Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Tseng, T.T., y Virk, P.S. (1999a) The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 257-279.
- Saier, M.H., Jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., Jack, D.L., Lal, E.C., Liu, H.J., Nusinew, D.P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tseng, T.T., Wachi, S., y Young, G.B. (1999b) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta* 1422: 1-56.
- Saier, M.H., Jr., y Tseng, T.T. (1999) Evolutionary origins of transmembrane transport systems. En *Transport of molecules across microbial membranes* (Symposium no. 58, Society for General Microbiology). Broome-Smith, J. K., Baumberg, S., Stirling, C. J. y Ward., F. B. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 252-274.
- Saier, M.H., Jr. (2000a) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.* 182: 5029-5035.
- Saier, M.H., Jr. (2000b) Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* 146 (Pt 8): 1775-1795.
- Saier, M.H., Jr. (2000c) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- Saier, M.H., Jr. (2003) Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.* 48: 1145-1156.
- Saier, M.H., Jr., Tran, C.V., y Barabote, R.D. (2006) TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 34: D181-186.
- Saier, M.H., Jr., Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G., y Elkan, C. (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res.* 37: D274-278.

- Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K., y Bryant, D.A. (1999) A novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 181: 7363-7372.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sánchez-Baracaldo, P., Hayes, P.K., y Blank, C.E. (2005) Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3: 145-166.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., y Kok, J. (1998) A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* 27: 299-310.
- Sarsero, J.P., Wookey, P.J., Gollnick, P., Yanofsky, C., y Pittard, A.J. (1991) A new family of integral membrane proteins involved in transport of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 3231-3234.
- Sarsero, J.P., y Pittard, A.J. (1995) Membrane topology analysis of *Escherichia coli* K-12 Mtr permease by alkaline phosphatase and beta-galactosidase fusions. *J. Bacteriol.* 177: 297-306.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., y Bannai, S. (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 11455-11458.
- Saurin, W., y Dassa, E. (1994) Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependent transport systems: evolution by recurrent gene duplications. *Protein Sci.* 3: 325-344.
- Saurin, W., Koster, 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.
- Saurin, W., Hofnung, M., y Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* 48: 22-41.
- Sawa, Y., Tani, M., Murata, K., Shibata, H., y Ochiai, H. (1994) Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. *J. Biochem.* 116: 995-1000.
- Scott, W.E., y Fay, P. (1972) Phosphorylation and amination in heterocysts of *Anabaena variabilis*. *Brit. Phycol. J.* 7: 283-284.
- Scripture, J.B., Voelker, C., Miller, S., O'Donnell, R.T., Polgar, L., Rade, J., Horazdovsky, B.F., y Hogg, R.W. (1987) High-affinity L-arabinose transport operon. Nucleotide sequence and analysis of gene products. *J. Mol. Biol.* 197: 37-46.
- Schmetterer, G. (1994) Cyanobacterial respiration. En *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 409-435.
- Schopf, J.W., y Walter, M.R. (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. En *The biology of cyanobacteria*. Carr, N. G. y Whitton, B. A. (eds.). Blackwell Scientific, Oxford. pp. 543-564.
- Schopf, J.W., y Packer, B.M. (1987) Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237: 70-73.

- Sedelnikova, S., Rice, D.W., Shibata, H., Sawa, Y., y Baker, P.J. (1998) Crystallization of the alanine dehydrogenase from *Phormidium lapideum*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 407-408.
- Severi, E., Javelle, A., y Merrick, M. (2007) The conserved carboxy-terminal region of the ammonia channel AmtB plays a critical role in channel function. *Mol. Membr. Biol.* 24: 161-171.
- Shao, Z., Lin, R.T., y Newman, E.B. (1994) Sequencing and characterization of the *sdac* gene and identification of the *sdacB* operon in *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 222: 901-907.
- Sherman, D.M., Tucker, D., y Sherman, L.A. (2000) Heterocyst development and localization of cyanophycin in N₂-fixing cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 (cyanobacteria). *J. Phycol.* 36: 932-941.
- Shuman, H.A. (1982) Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 257: 5455-5461.
- Slewe, R.M., Weil, B., Burkovski, A., Eikmanns, B.J., Eikmanns, M., y Kramer, R. (1996) Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 271: 5398-5403.
- Simon, R.D. (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies. En *The cyanobacteria*. Fay, P. y Van Baalen (eds.). Elsevier Science Publishers B. V., Nueva York. pp. 119-225.
- Slotboom, D.J., Konings, W.N., y Lolkema, J.S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 293-307.
- Smith, M.T., y Emerich, D.W. (1993) Alanine dehydrogenase from soybean nodule bacteroids: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 379-385.
- Sophianopoulou, V., y Diallfnas, G. (1995) Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 53-75.
- Soupe, E., He, L., Yan, D., y Kustu, S. (1998) Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7030-7034.
- Speiser, D.M., y Ames, G.F. (1991) *Salmonella typhimurium* histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding proteins. *J. Bacteriol.* 173: 1444-1451.
- Spiller, H., y Shanmugam, K.T. (1987) Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1. *J. Bacteriol.* 169: 5379-5384.
- Stal, L.J., y Krumbein, W.E. (1985) Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Arch. Microbiol.* 143: 72-76.
- Stal, L.J., y Krumbein, W.E. (1987) Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Arch. Microbiol.* 149: 76-80.
- Stal, L.J., y Zehr, J.P. (2008) Cyanobacterial nitrogen fixation in the ocean: diversity, regulation, and ecology. En *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Herrero, A. y Flores, E. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press. pp. 423-446.
- Stanier, R.Y., y Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.

- Stewart, W.D., y Lex, M. (1970) Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum* strain 594. *Arch. Microbiol.* 73: 250-260.
- Stewart, W.D., y Codd, G.A. (1975) Polyhedral bodies (carboxysomes) of nitrogen-fixing blue-green algae. *Br. Phycol. J.* 10: 273-278.
- Stewart, W.D., y Rowell, P. (1975) Effects of L-methionine-DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 846-856.
- Stucky, K., Hagting, A., Klein, J.R., Matern, H., Henrich, B., Konings, W.N., y Plapp, R. (1995) Cloning and characterization of *brnQ*, a gene encoding a low-affinity, branched-chain amino acid carrier in *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* DSM7290. *Mol. Gen. Genet.* 249: 682-690.
- Summers, M.L., Wallis, J.G., Campbell, E.L., y Meeks, J.C. (1995) Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.* 177: 6184-6194.
- Szvetnik, A., Gal, J., y Kalman, M. (2007) Membrane topology of the GltS Na⁺/glutamate permease of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275: 71-79.
- Takatani, N., y Omata, T. (2006) Effects of P_{II} deficiency on expression of the genes involved in ammonium utilization in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 47: 679-688.
- Tam, R., y Saier, M.H., Jr. (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 320-346.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunschiers, R., y Lindblad, P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 1-20, table of contents.
- 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.
- Tandeau de Marsac, N. (1994) Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. En *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). Dordrecht, Holanda. Kluwer Academic Publishers. pp. 825-842.
- Tandeau de Marsac, N. (2003) Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynth. Res.* 76: 193-205.
- Tanigawa, R., Shirokane, M., Maeda Si, S., Omata, T., Tanaka, K., y Takahashi, H. (2002) Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4251-4255.
- Tauch, A., Hermann, T., Burkovski, A., Kramer, R., Puhler, A., y Kallinowski, J. (1998) Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product. *Arch. Microbiol.* 169: 303-312.
- Thiel, T., y Leone, M. (1986) Effect of glutamine on growth and heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 168: 769-774.
- Thiel, T. (1988) Transport of leucine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* 149: 466-470.

- Thomas, G.H., Mullins, J.G., y Merrick, M. (2000) Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.* 37: 331-344.
- Thomas, G.H., Southworth, T., Leon-Kempis, M.R., Leech, A., y Kelly, D.J. (2006) Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiology* 152: 187-198.
- Thomas, J., Meeks, J.C., Wolk, C.P., Shaffer, P.W., y Austin, S.M. (1977) Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 129: 1545-1555.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., y Ohno, T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5442-5447.
- Tossi, A., Sandri, L., y Giangaspero, A. (2002) New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids. *Proceedings of the 27th European Peptide Symposium*. Sorrento, Italia.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., y Koronakis, V. (2004) Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53: 697-706.
- Trias, J., Rosenberg, E.Y., y Nikaido, H. (1988) Specificity of the glucose channel formed by protein D1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 938: 493-496.
- 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.
- Tumer, N.E., Robinson, S.J., y Haselkorn, R. (1983) Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular of fixed nitrogen. *Nature* 306: 337-342.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., y Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 327-338.
- Tusnády, G.E., y Simon, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283: 489-506.
- Tusnády, G.E., y Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-850.
- Valladares, A., Muro-Pastor, A.M., Fillat, M.F., Herrero, A., y Flores, E. (1999) Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin:NADP⁺ reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.* 449: 159-164.
- Valladares, A. (2001) Transporte de urea y estudio de promotores de genes regulados por nitrógeno en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Valladares, A., Montesinos, M.L., Herrero, A., y Flores, E. (2002) An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 43: 703-715.
- Valladares, A., Herrero, A., Pils, D., Schmetterer, G., y Flores, E. (2003) Cytochrome *c* oxidase genes required for nitrogenase activity and diazotrophic growth in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 47: 1239-1249.
- Valladares, A., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., y Flores, E. (2004) The NtcA-dependent P₁ promoter is utilized for *glnA* expression in N₂-fixing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 186: 7337-7343.

- Valladares, A., Maldener, I., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Herrero, A. (2007) Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 189: 4425-4430.
- Valladares, A., Flores, E., y Herrero, A. (2008) Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 190: 6126-6133.
- van der Does, C., y Tampé, R. (2004) Changing orders—primary and secondary membrane transporters revised. *ChemBiochem* 5: 1171-1175.
- Vancura, A., Vancurova, I., Volc, J., Jones, S.K., Flieger, M., Basarova, G., y Behal, V. (1989) Alanine dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 179: 221-227.
- Vancurova, I., Vancura, A., Volc, J., Neuzil, J., Flieger, M., Basarova, G., y Behal, V. (1988) Purification and partial characterization of alanine dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*. *Arch. Microbiol.* 150: 438 - 440.
- Vázquez-Bermúdez, M.F. (2000) Estudios sobre el control de la asimilación del nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus* sp. mediado por el regulador transcripcional NtcA. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Flores, E., y Herrero, A. (2002a) Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1578: 95-98.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Herrero, A., y Flores, E. (2002b) 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* 512: 71-74.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Paz-Yepes, J., Herrero, A., y Flores, E. (2002c) The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* 148: 861-869.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Herrero, A., y Flores, E. (2003) Carbon supply and 2-oxoglutarate effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 155-159.
- Vega-Palás, M.A., Madueno, F., Herrero, A., y Flores, E. (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 172: 643-647.
- Vega-Palás, M.A., Flores, E., y Herrero, A. (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* 6: 1853-1859.
- Venter, H., Shilling, R.A., Velamakanni, S., Balakrishnan, L., y Van Veen, H.W. (2003) An ABC transporter with a secondary-active multidrug translocator domain. *Nature* 426: 866-870.
- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494.
- Vrljić, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M.J., Sahn, H., Kozina, V.J., Eggeling, L., y Sailer, M.H., Jr. (1999) The LysE superfamily: topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 327-336.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Walsby, A.E. (1985) The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 226: 345-366.
- Walsby, A.E. (2007) Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange. *Trends Microbiol.* 15: 340-349.
- Walshaw, D.L., y Poole, P.S. (1996) The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Mol. Microbiol.* 21: 1239-1252.
- Walshaw, D.L., Lowthorpe, S., East, A., y Poole, P.S. (1997) Distribution of a sub-class of bacterial ABC polar amino acid transporter and identification of an N-terminal region involved in solute specificity. *FEBS Lett.* 414: 397-401.
- Weickert, M.J., y Adhya, S. (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* 267: 15869-15874.
- Weissenborn, D.L., Wittekindt, N., y Larson, T.J. (1992) Structure and regulation of the glpFK operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 267: 6122-6131.
- Wildon, D.C., y Mercer, F.V. (1963) The ultrastructure of the heterocyst and akinete of the blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 47: 19-31.
- Wilkinson, A.J., y Verschueren, K.H.G. (2003) Crystal structures of periplasmic solute-binding proteins in ABC transport complexes illuminate their function. En *ABC proteins: from bacteria to man*. Holland, I. B., Cole, S. P. C., Kuchler, K., y Higgins, C. F. (ed.). Academic Press, Londres. pp. 187-207.
- Winkenbach, F., Wolk, C.P., y Jost, M. (1972) Lipids of membranes and of the cell envelope in heterocysts of a blue-green alga. *Planta* 107: 69-80.
- Winkenbach, F., y Wolk, C.P. (1973) Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant Physiol.* 52: 480-483.
- Wisén, S., Sjogren, T., Olin, B., y Mannervik, B. (2004) Purification, crystallization and preliminary X-ray data of the transcription factor NtcA from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60: 923-925.
- Wissenbach, U., Six, S., Bongaerts, J., Ternes, D., Steinwachs, S., y Uuden, G. (1995) A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the *artPIQMJ* genes, arginine binding and transport. *Mol. Microbiol.* 17: 675-686.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolk, C.P. (1968) Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 96: 2138-2143.
- Wolk, C.P., Austin, S.M., Bortins, J., y Galonsky, A. (1974) Autoradiographic localization of ^{13}N after fixation of ^{13}N -labeled nitrogen gas by a heterocyst-forming blue-green alga. *J. Cell Biol.* 61: 440-453.
- Wolk, C.P., Thomas, J., Shaffer, P.W., Austin, S.M., y Galonsky, A. (1976) Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ^{13}N -labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251: 5027-5034.

Wolk, C.P. (1980) Cyanobacteria (blue-green algae). En *The biochemistry of plants*. Tolbert, N. E. (ed.). Academic Press, Nueva York. pp. 659-687.

Wolk, C.P. (1982) Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria*. Carr, N. G. y Whitton, B. A. (eds.). Blackwell Scientific Publishers, Oxford. pp. 359-386.

Wolk, C.P., Cai, Y., Cardemil, L., Flores, E., Hohn, B., Murry, M., Schmetterer, G., Schrautemeier, B., y Wilson, R. (1988) Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.* 170: 1239-1244.

Wolk, C.P. (1989) Alternative models for the development of the pattern of spaced heterocysts in *Anabaena* (Cyanophyta). *Plant Syst. Evol.* 164: 27-31.

Wolk, C.P., Elhai, J., Kuritz, T., y Holland, D. (1993) Amplified expression of a transcriptional pattern formed during development of *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* 7: 441-445.

Wolk, C.P., Ernst, A., y Elhai, J. (1994) Heterocyst metabolism and development. En *The molecular biology of cyanobacteria*. Bryant, D. A. (ed.). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 769-823.

Wolk, C.P. (1996) Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.* 30: 59-78.

Wolk, C.P., Zhou, J., y Kong, R. (1999) Genetic analysis of heterocyst formation. En *The phototrophic prokaryotes*. Peschek, G. A., Löffelhardt, W. y Peschek, G. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Nueva York. pp. 509-515.

Wolk, C.P. (2000) Heterocyst formation in *Anabaena*. En *Prokaryotic development*. Brun, Y. V. y Shimkets, L. J. (eds.). American Society for Microbiology, Washington DC. pp. 83-104.

Wood, N.B., y Haselkorn, R. (1976) Protein degradation during heterocyst development in *Anabaena*. En *Proc. 2nd Int. Symp. Photosynth. Prokaryotes*. Codd, G. A. y Stewart, W. D. P. (eds.). Dundee, Escocia.

Wood, N.J., Alizadeh, T., Richardson, D.J., Ferguson, S.J., y Moir, J.W. (2002) Two domains of a dual-function NarK protein are required for nitrate uptake, the first step of denitrification in *Paracoccus pantotrophus*. *Mol. Microbiol.* 44: 157-170.

Wookey, P.J., y Pittard, A.J. (1988) DNA sequence of the gene (*tyrP*) encoding the tyrosine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 4946-4949.

Xu, P., y McAuley, P.J. (1990) Uptake of amino acids by the cyanobacterium *Anabaena* ATCC 27893. *New Phytol.* 115: 581-585.

Xu, X., Elhai, J., y Wolk, P. (2008) Transcriptional and developmental responses by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen. En *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Herrero, A. y Flores, E. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk. pp. 383-422.

Yamanaka, G., y Glazer, A.N. (1983) Phycobiliproteins in *Anabaena* 7119. En *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function*. Papageorgiou, G. L y Packer, L. (eds.). Elsevier Science Publishers B. V., Nueva York. pp. 69-94.

Yan, R.T., y Maloney, P.C. (1993) Identification of a residue in the translocation pathway of a membrane carrier. *Cell* 75: 37-44.

Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y., y Gouaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431: 811-818.

Yoon, H.S., y Golden, J.W. (1998) Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* 282: 935-938.

- Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V., Tokmakova, I.L., Troshin, P.V., y Livshits, V.A. (1999) The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* 452: 228-232.
- Zarbiv, R., Grunewald, M., Kavanaugh, M.P., y Kanner, B.I. (1998) Cysteine scanning of the surroundings of an alkali-ion binding site of the glutamate transporter GLT-1 reveals a conformationally sensitive residue. *J. Biol. Chem.* 273: 14231-14237.
- Zehr, J.P., Bench, S.R., Carter, B.J., Hewson, I., Niazi, F., Shi, T., Tripp, H.J., y Affourtit, J.P. (2008) Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science* 322: 1110-1112.
- Zhang, C.C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., y Bedu, S. (2006) Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol. Microbiol.* 59: 367-375.
- Zhang, Z., Felge, J.N., Chang, A.B., Anderson, I.J., Brodianski, V.M., Vitreschak, A.G., Gelfand, M.S., y Saier, M.H., Jr. (2003) A transporter of *Escherichia coli* specific for L- and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily. *Arch. Microbiol.* 180: 88-100.
- Zheng, L., Kostrewa, D., Berneche, S., Winkler, F.K., y Li, X.D. (2004) The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17090-17095.
- Zheng, S., y Haselkorn, R. (1996) A glutamate/glutamine/aspartate/asparagine transport operon in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Microbiol.* 20: 1001-1011.
- Zhu, J., Kong, R., y Wolk, C.P. (1998) Regulation of *hepA* of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by elements 5' from the gene and by *hepK*. *J. Bacteriol.* 180: 4233-4242.
- Ziegler, K., Deutzmann, R., y Lockau, W. (2002) Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 57: 522-529.
- Zubkov, M.V., Fuchs, B.M., Tarran, G.A., Burkill, P.H., y Amann, R. (2003) High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1299-1304.