

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ASIMILACIÓN DE AMONIO EN CIANOBACTERIAS

Francisco. J. Florencio

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.
Universidad de Sevilla-CSIC.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son microorganismos capaces de asimilar del medio externo diferentes formas de nitrógeno, como nitrato, nitrito, urea, amonio ó N_2 , que en el interior celular se convierten en amonio, que es incorporado a esqueletos carbonados a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), constituyendo el denominado ciclo GS-GOGAT, cuyo producto neto es una molécula de glutamato por ciclo. La cianobacteria unicelular *Synechocystis* 6803 presenta dos GS, denominadas GSI y GSIII, cuyos correspondientes genes son *glnA* y *glnN*, e igualmente presenta dos GOGATs denominadas GltS y GltB-GltD, que dependen como donador de electrones de ferredoxina y NADH respectivamente. Otras cianobacterias como la fijadora de dinitrógeno *Anabaena* 7120, presenta solamente una GS, y una sola GOGAT. La GS constituye el punto central de la regulación del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias, de tal modo, que su control permite en última instancia modular el flujo de nitrógeno al metabolismo celular. La expresión de los genes correspondientes, y su propia actividad se encuentran reguladas en función de distintos factores ambientales, fundamentalmente la fuente de nitrógeno y las condiciones fotosintéticas, mientras que la GOGAT no

parece regularse por dichos factores. En este trabajo se presentan datos acerca de los elementos que participan en la asimilación del amonio y su regulación.

ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN CIANOBACTERIAS.

Las cianobacterias son capaces de utilizar como fuente de nitrógeno nitrato, nitrito y amonio y determinadas especies también urea (Guerrero y Lara, 1987; Flores y Herrero, 1994). Además, las cianobacterias fijadoras, pueden utilizar también el dinitrógeno atmosférico. El amonio es además la fuente preferida de nitrógeno lo que se traduce en una inhibición por amonio de la utilización de las otras fuentes alternativas.

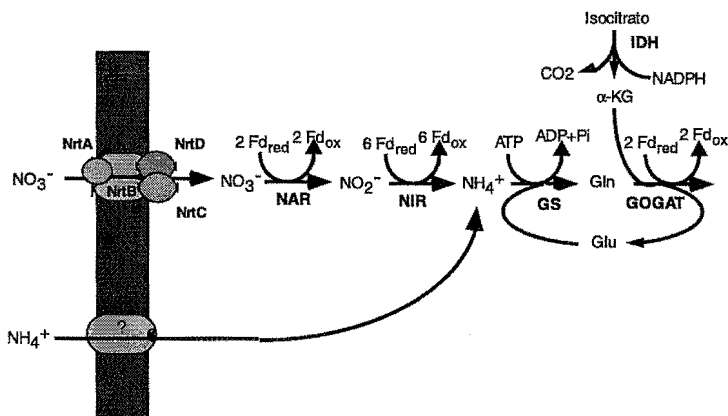


Figura 1.- Vías de asimilación de nitrato y amonio en cianobacterias.

Asimilación de nitrato

La asimilación del nitrato como se muestra en la Figura 1 tiene lugar mediante un proceso que comprende dos pasos: 1) transporte activo del nitrato al interior celular (Flores *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992), y 2) su posterior reducción hasta amonio mediante la acción secuencial de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (Manzano *et al.*, 1976; Candau, 1979; Guerrero *et al.*, 1981). En la cianobacteria unicelular

Synechococcus 7942, los genes estructurales para todas las proteínas implicadas en el transporte y reducción del nitrato hasta amonio, se encuentran formando una misma unidad transcripcional (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993). Una estructura similar en la organización de estos genes existe también en *Synechocystis* 6803 (Kaneko *et al.*, 1996). El nitrato y el nitrito se transportan activamente a través de un sistema multicomponente de 4 polipéptidos productos de los genes *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD* (Omata *et al.*, 1993). La nitrato y la nitrito reductasas son ambas dependientes de ferredoxina reducida (Manzano *et al.*, 1976; Méndez *et al.*, 1981) y están codificadas por los genes *narB* y *nirA* respectivamente (Andriessse *et al.*, 1990, Luque *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993).

En todas las cianobacterias estudiadas el amonio ejerce un efecto doble sobre la asimilación de nitrato. Por una parte inhibe de forma inmediata el proceso de transporte de nitrato (Ohmori *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1980; Lara *et al.*, 1987), y por otra, el amonio reprime la transcripción del operón *nirAnrtABCDnarB* (Suzuki *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994). La inhibición de la ruta GS-GOGAT con inhibidores de la GS (MSX) o de la GOGAT (azaserina y DON) suprime ambos efectos del amonio (Flores *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1993), sugiriendo que no es el amonio *per se*, sino productos de su metabolización a través de la ruta GS-GOGAT, los que ejercerían ese efecto represor.

En las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno, al contrario de lo descrito para el caso de las especies no fijadoras, se requiere la presencia de nitrato o nitrito como inductor de la expresión de la nitrato y la nitrito reductasas, así como del sistema de transporte de nitrato (Herrero *et al.*, 1981).

La ruta GS-GOGAT

Como se presenta en la Figura 1, el amonio se incorpora al esqueleto carbonado a través de la actuación secuencial de dos enzimas, la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, y que se conoce con el nombre de ciclo GS-GOGAT, el rendimiento neto de este ciclo es la formación de una molécula de glutamato, requiriéndose 2-oxoglutarato, amonio, ATP y

poder reductor en forma de ferredoxina reducida. Dicha ruta por tanto requiere del concurso no solo de dichas dos enzimas, sino además del aporte de esqueletos carbonados que lleva acabo la isocitrato deshidrogenasa. Esta ruta es pues un punto central de regulación de la asimilación del nitrógeno en cianobacterias y a ella vamos a dedicar el resto de este trabajo.

El aporte de esqueletos carbonados. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos

Las cianobacterias, presentan un ciclo incompleto de los ácidos tricarbóxicos (Pearce *et al.*, 1969; Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Esta circunstancia incapacita a la generalidad de las cianobacterias para crecer en la oscuridad a expensas de los sustratos normalmente oxidados a través de este ciclo en otros organismos. La carencia del complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa es la responsable de la ausencia de un ciclo de Krebs completo en cianobacterias (Pearce *et al.*, 1969, Kaneko *et al.*, 1996). Alternativamente, la degradación de compuestos orgánicos, azúcares fundamentalmente, se lleva a cabo en cianobacterias a través de la ruta oxidativa de las pentosas-fosfato (Smith, 1982).

Las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que si están presentes en estos organismos, tienen por consiguiente un papel biosintético en la formación de aminoácidos (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). La operatividad de esta ruta metabólica requiere la función anaplerótica de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la cual es esencial en la síntesis de precursores de aminoácidos pertenecientes a la familia del aspartato y el glutamato y de tetrapirroles (Smith, 1982). Estos dos aminoácidos, sintetizados a partir de oxalacetato y 2-oxoglutarato respectivamente, son los donadores primarios de grupos α -amino en las reacciones de transaminación.

El aporte de 2-oxoglutarato, esqueleto carbonado necesario para la síntesis de glutamato por la ruta GS-GOGAT, relaciona directamente la asimilación de nitrógeno con el metabolismo del carbono y mas concretamente con los cetoácidos provenientes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Mediante experimentos de incorporación de ^{14}C en los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se ha comprobado que el marcaje de citrato y 2-oxoglutarato es superior que el observado en malato y oxalacetato (Lawrie *et al.*, 1976). Este flujo preferencial de carbono por la rama del ciclo cuyo producto final es el 2-oxoglutarato, es consistente con el hecho de que la síntesis de glutamato y glutamina a partir de este cetoácido y a través de la ruta GS-GOGAT constituye la reacción aminante primaria y el núcleo central en la asimilación y distribución del nitrógeno en cianobacterias.

En la Figura 2 se muestra la estrecha relación existente entre la ruta de los ácidos tricarbóxicos y la ruta GS-GOGAT de asimilación de amonio en cianobacterias.

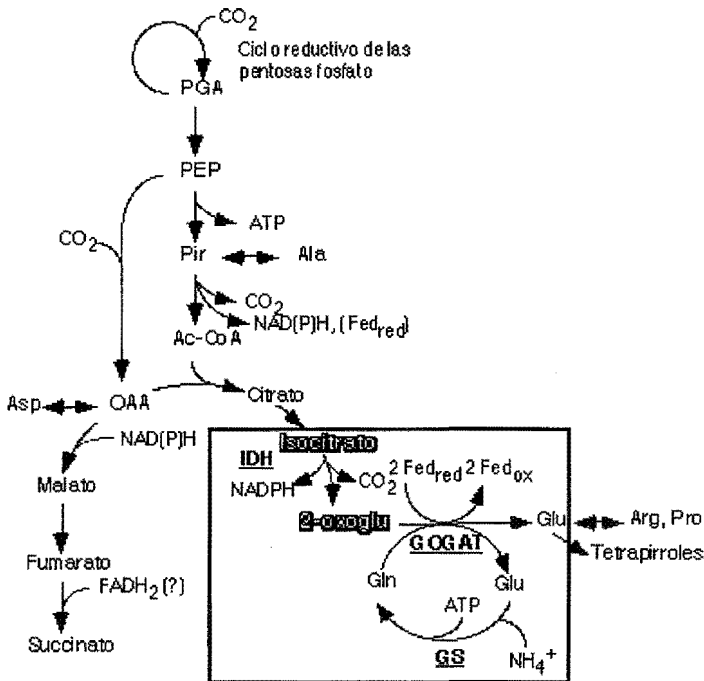


Figura 2. Esquema de las principales rutas metabólicas de asimilación de carbono y su interacción con el nitrógeno en cianobacterias.

LOS ENZIMAS Y GENES

Isocitrato deshidrogenasa

La isocitrato deshidrogenasa, como enzima implicada directamente en la producción de 2-oxoglutarato, representa en cianobacterias la etapa final de una de las ramas del ciclo incompleto de los ácidos tricarbónicos. El 2-oxoglutarato producido tras la descarboxilación oxidativa del isocitrato es el esqueleto carbonado necesario para la asimilación del amonio por la ruta GS-GOGAT.

Los datos existentes en la literatura acerca de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos en cianobacterias son muy escasos, y se limitan en su mayoría a determinaciones de actividades enzimáticas (Pearce *et al.*, 1969; Neuer y Bothe, 1982), no habiéndose realizado hasta el momento estudios exhaustivos de la mayoría de estas enzimas.

La isocitrato deshidrogenasa ha sido quizás la enzima más estudiada de la ruta al ser la etapa final de la misma. En todas las cianobacterias en las que se ha estudiado se ha descrito la existencia de una única enzima con actividad isocitrato deshidrogenasa, estrictamente dependiente de NADP y de cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) para su funcionalidad (Friga y Farkas, 1981; Papen *et al.*, 1983).

La NADP-isocitrato deshidrogenasa ha sido purificada y caracterizada por nuestro grupo a partir de las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Muro-Pastor y Florencio, 1992, 1994). La enzima está compuesta por dos subunidades idénticas ($M_r = 57,000$) y muestra cinética y parámetros moleculares similares a los de la NADP-IDH de *E. coli*. El gen correspondiente *icd* ha sido igualmente clonado en ambas cianobacterias, complementando una estirpe de *E. coli* carente de dicho gen (Muro-Pastor y Florencio, 1994, Muro-Pastor *et al.*, 1996). La secuencia deducida de aminoácidos muestra una alta homología con la correspondiente de *E. coli* y son entre ambas cianobacterias 78% idénticas. El intento de obtener mutantes de dicho gen, no fue posible en ambas cianobacterias, indicando que es un gen esencial para el crecimiento de las mismas, especialmente en el caso de la cianobacteria fijadora de dinitrógeno, mutantes con bajos niveles de

actividad IDH, mostraban una incapacidad para poder crecer utilizando el dinitrógeno como única fuente de dinitrógeno (Muro-Pastor y Florencio, 1994, Muro-Pastor *et al.*, 1996), lo que sugiere un requerimiento esencial de esta enzima en el heterocisto, donde presenta niveles más elevados que en las células vegetativas, probablemente como productora de NADPH, necesario para la reducción de ferredoxina, que en última instancia actúa como donador de electrones para la nitrogenasa.

Glutamato sintasa

Hasta bien reciente se pensaba en la existencia de una sola enzima monomérica dependiente de ferredoxina conteniendo un centro sulfoférrico (3Fe-4S) y una molécula de FMN (Marqués *et al.*, 1992, Navarro *et al.*, 1995), pero en algunas cianobacterias se han podido detectar dos enzimas con actividad glutamato sintasa, una dependiente de ferredoxina, (Fd-GOGAT) que está codificada por el gen *gltS* y una segunda enzima dependiente de NADH, (NADH-GOGAT) formada por dos subunidades distintas y codificada por los genes *gltD* y *gltB*. Hasta el momento solo se han purificado las Fd-GOGAT de las cianobacterias *Synechococcus* sp. PCC 6301, y *Synechocystis* sp. PCC 6803, esta enzima tiene un Mr \approx 170.000, y requiere ferredoxina como donador de electrones (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1996). *Synechocystis* 6803 es una de las cianobacterias que contienen ambas GOGATs, se han construido mutantes carentes bien de la Fd-GOGAT ó bien de la NADH-GOGAT, y ambos son viables en las diferentes condiciones de cultivo, indicando que ambas son perfectamente funcionales, no obstante un doble mutante carente de actividad GOGAT no era viable, aún cuando esta cianobacteria contiene una actividad NADP-glutamato deshidrogenasa (Navarro *et al.*, 1995).

El análisis filogenético de las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes *gltS* y *gltB* de *Synechocystis* 6803 con otras secuencias de glutamato sintasas, claramente indican que los genes de cianobacterias han debido ser los precursores de los que actualmente poseen las plantas y algas, a través de la cianobacteria que dió origen al cloroplasto, en el caso de plantas ambos genes están actualmente transferidos al núcleo

como queda reflejado en la Figura 3, donde se muestra que existen tres grupos claramente diferenciados de glutamato sintasas, según la dependencia de donador de electrones, las Fd, las NADH, y las NADPH dependiente, estas últimas son típicas de bacterias como *E. coli*.

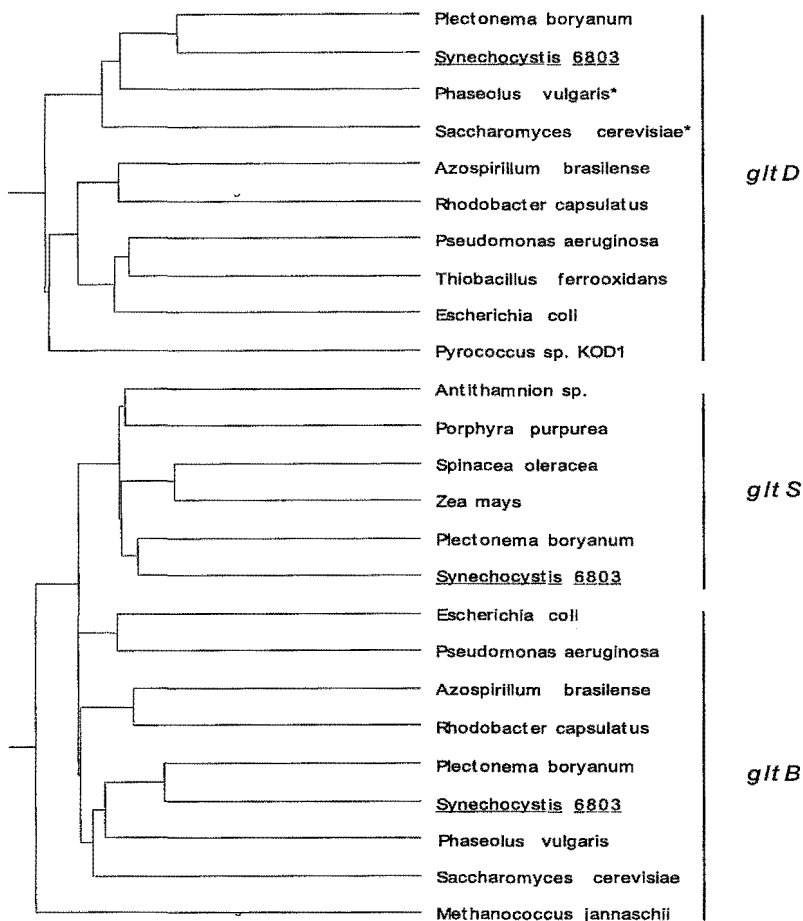


Figura 3. Arbol filogenético de las glutamato sintasas. Las distintas secuencias han sido obtenidas de las bases de datos GenBank/EMBL

Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa es una de las enzimas claves del metabolismo celular ya que en ella se une el metabolismo del nitrógeno y el del carbono, por tanto su función es crítica en el funcionamiento del metabolismo celular y está en general sujeta a una regulación muy fina. Existen tres tipos distintos de glutamina sintetasa. La mayoría de los procariotas contiene una GS, formada por doce subunidades idénticas, (Mr 50,000) que están formando dos anillos hexagonales, a esta GS se le denomina GSI. En eucariotas existe una GS, denominada GSII, y es una enzima octamérica con subunidades de Mr \simeq 40000. En algunos procariotas, como las familias de las *Rizobiaceas* y ciertas especies de *Actinomyces* presentan tanto la GSI como la GSII (Merrick y Edwards, 1995). Un tercer tipo de GS denominada GSIII, compuesta de 6 subunidades idénticas, se identificó recientemente en bacterias anaerobias estrictas, como *Bacteroides fragilis*, que se encuentran en el rumen de mamíferos (Southern *et al.*, 1986). Los tres tipos de GS señalados son bastante diferentes en su secuencia de aminoácidos, no obstante 5 dominios relacionados con el sitio activo de la enzima se conservan en todas ellas (Reyes y Florencio, 1994a).

En cianobacterias existe una típica GSI procariótica, codificada por el gen *glnA*, que ha sido purificada y caracterizada en diversas especies como *Anabaena* 7120, *Synechococcus*, *Calothrix*, *Phormidium* y *Synechocystis*. Todas ellas presentan una GSI similar en tamaño y composición de subunidades. El gen *glnA* de diversas cianobacterias ha sido clonado y secuenciado, mostrando en todos los casos una alta identidad, de hecho mayor del 76%, indicando una alta conservación entre ellas (Reyes y Florencio, 1994a).

En la cianobacteria *Synechocystis* 6803, se ha obtenido un mutante carente de GSI que sin embargo no requería glutamina para su crecimiento, un estudio exhaustivo de dicho mutante reveló la existencia de una segunda glutamina sintetasa en esta cianobacteria. La secuenciación del gen correspondiente *glnN* demostró que el producto de dicho gen era una GS tipo III, homologa a la de *Bacteroides fragilis* (44%

identidad) y a *Butyrivibrio fibrisolvens* (41% identidad) (Reyes y Florencio, 1994a). LA GSIII de *Synechocystis* ha sido purificada, y sus requerimientos de cationes y sustratos son similares a los de las GSI y GSII, siendo la Km aparente para el ATP, amonio y glutamato parecida a las de la GSI de *Synechocystis* (Garcia-Dominguez *et al.*, 1997). Esta enzima se encuentra en la mayoría de las cianobacterias unicelulares, pero está ausente de las filamentosas fijadoras de dinitrógeno ((Reyes y Florencio, 1994a; Garcia-Dominguez *et al.*, 1997). Recientemente hemos encontrado que la cianobacteria *Pseudanabaena* 6903, solo contiene la GSIII y carece naturalmente de la GSI (Crespo *et al.*, 1998), por tanto en cianobacterias existen las tres posibilidades, solo con GSI, como *Anabaena* 7120, solo GSIII, como *Pseudanabaena* 6903, y ambas GSs, como *Synechocystis* 6803, la relación filogenética entre las distintas glutamina sintetasas se muestra en la Figura 4, claramente las GSIII parecen ser más ancestrales que los otros dos tipos, y bien en cianobacterias ambas existieron desde un principio, ó la GSI fue una adquisición posterior a lo largo de la evolución que ha ido reemplazando a la GSIII, esto requeriría un estudio evolutivo más amplio y exhaustivo, utilizando un mayor número de especies cianobacterianas.

El mutante de *Synechocystis* carente del gen *glnA*, era viable usando nitrato como fuente de nitrógeno, pero no crecía en presencia de amonio, mientras que los mutantes del gen *glnN* crecían en todas las condiciones de cultivo independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada. Mutantes doble *glnA-glnN*, no fue posible obtenerlo, indicando claramente que las cianobacterias necesitan una GS activa para su crecimiento (Reyes y Florencio, 1994b).

REGULACIÓN DEL CICLO GS-GOGAT

El control del ciclo GS-GOGAT, es fundamental para mantener los niveles intracelulares de diversos metabolitos, especialmente cuando se producen cambios, en las condiciones nutricionales de estas bacterias. La glutamina producida por la GS no es solo utilizada en la síntesis de proteínas, sino que también actúa como donador de grupos amido en

diversas reacciones, en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y amino azúcares, por tanto el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutamina, constituye un punto importante de control en la mayoría de los microorganismos. De hecho la adición de amonio a un cultivo de *Synechocystis* 6803 creciendo en nitrato como fuente de nitrógeno, produce un cambio en la concentración intracelular de los aminoácidos relacionados con el ciclo GS-GOGAT (Mérida *et al.*, 1991), de tal modo que el nivel de glutamina aumenta unas 30-60 veces y el de glutamato disminuye en la misma proporción. Este dato sugiere que la eficiencia del ciclo se incrementa en presencia de amonio, pero el mantenimiento de los niveles de aminoácidos requiere un reajuste de dicho ciclo. Este proceso de control veremos que se lleva a cabo fundamentalmente controlando los niveles y la actividad de la GS, y del aporte de carbono al ciclo a través de la IDH, es decir a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Expresión de los genes del ciclo GS-GOGAT

Como hemos indicado anteriormente la GS, va a ser el objeto principal de control. La expresión del gen *glnA*, que codifica para la GSI, se ha estudiado en varias cianobacterias, incluyendo *Synechocystis* 6803. En la mayoría de estos estudios se ha podido constatar que la expresión del gen *glnA* es máxima en condiciones de deficiencia de nitrógeno, y mínima, cuando las células crecen utilizando amonio como fuente nitrógenada, representando el nitrato un nivel intermedio de expresión (Reyes *et al.*, 1997). El gen *icd* que codifica para la NADP-IDH, responde de un modo similar a las diferentes condiciones nutricionales, en lo que respecta a la fuente de nitrógeno (Muro-Pastor *et al.*, 1996). Sin embargo en el caso de *Synechocystis* 6803, el gen *glnN*, que codifica para la GSIII, presenta una expresión alta de dicho gen, solo en condiciones de deficiencia en nitrógeno, y su expresión es prácticamente nula en presencia de amonio en el medio de cultivo (Reyes y Florencio, 1994a). Los genes que codifican para las dos glutamato sintetasas, *gltS*, *gltB* y *gltD*, no parecen afectarse por la disponibilidad de nitrógeno, lo que confirma por otro lado que el punto central de regulación se ejerce a nivel de la primera enzima del ciclo.

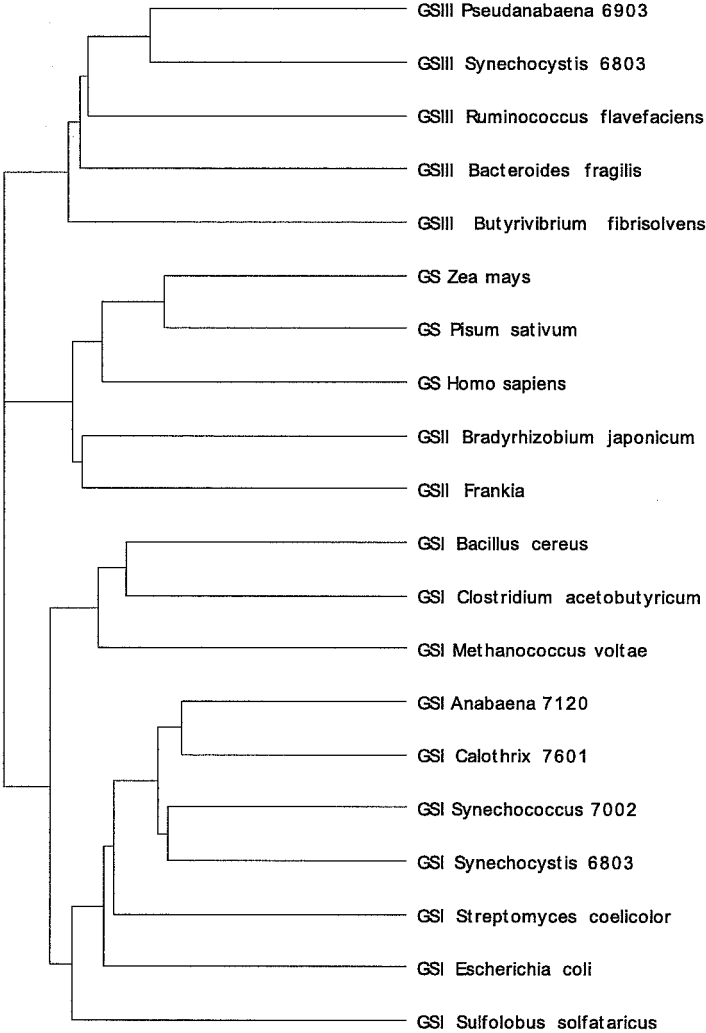


Figura 4. Arbol filogenético de las glutamina sintetetas. Las secuencias fueron obtenidas de las bases de datos GeneBank/EMBL.

El control transcripcional de los genes *glnA*, *glnN* y *icd* parecen ser llevados a cabo por el activador transcripcional NtcA. El gen que codifica

este activador transcripcional (*ntcA*) se clonó por complementación de mutantes pleiotrópicos, incapaces de crecer en nitrato y su producto (NtcA) es una proteína perteneciente a la familia de los reguladores transcripcionales CRP y FNR de *E. coli* (Vega-Palas *et al.*, 1992). NtcA también es homóloga a la proteína CysR de *Synechococcus* 7942, la cual se requiere para la regulación del sistema de asimilación de azufre (Laudenbach y Grossman, 1991).

NtcA interacciona con el ADN habiéndose demostrado su unión a secuencias de las zonas promotoras de los genes *nirA*, *glnA* y del propio gen *ntcA* de *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.*, 1994). La estructura consenso para los promotores que requieren NtcA en *Synechococcus* 7942 es la siguiente:

GTA....N₈....TAC.....N₂₂.....TAN₃T.N₄₋₅

Aparece, por lo tanto, una típica caja -10, pero en lugar de la caja -35 aparece una secuencia palindrómica a la cual se une NtcA.

NtcA se encuentra también en otras cianobacterias como *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 (Frías *et al.*, 1993). De hecho, el factor VF1 descubierto en *Anabaena* 7120 y caracterizado como una proteína capaz de unirse a los promotores de los genes *xisA*, *glnA* y *rbcLS*, ha resultado ser la proteína homóloga a NtcA en *Anabaena* 7120 (Chastain *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 1993; Ramasubramanian *et al.*, 1994). En *Synechocystis* 6803, nuestro grupo ha demostrado que NtcA, purificado a partir de su expresión en *E. coli*, mediante una fusión a la proteína GST, es capaz de unirse a los promotores de los genes anteriormente citados, excepto al promotor del gen *glnN*. (Reyes *et al.*, 1997, Muro-Pastor *et al.*, 1996). De hecho la expresión de dicho gen, como se indicó anteriormente es diferente al modelo de expresión de *glnA* y *icd*, ya que *glnN* se transcribe principalmente en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Además de la fuente de nitrógeno, otros factores pueden afectar la expresión de los genes del ciclo GS-GOGAT, especialmente *glnA*, así los cambios en las condiciones fotosintéticas y el transporte de electrones

tanto fotosintético como respiratorio controlan la transcripción de *glnA* en *Synechocystis* 6803 (Reyes et al., 1995).

Regulación de la actividad GS

La adición de amonio a cultivos de diversas cianobacterias que utilizan nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno resulta en un lento descenso de la actividad GS, que puede llegar a ser del 50% 10 a 20 h después de la adición del catión, atribuible a una represión de la síntesis de la enzima por amonio (Rowell *et al.*, 1979; Tuli y Thomas, 1981; Orr y Haselkorn, 1982). Sin embargo, en la cianobacteria *Synechocystis* 6803, la adición de amonio a células cultivadas en nitrato, provoca un fuerte y rápido descenso de la actividad GS alcanzando un 10% de la actividad inicial solo 20-30 min después de la adición del amonio (Mérida *et al.*, 1991a). La enzima inactiva es rápidamente reactivada *in vivo* cuando el amonio desaparece del medio de cultivo. La GS inactiva es reactivable *in vitro* por tratamientos como aumento de la fuerza iónica o del pH del tampón o por incubación con fosfatasa alcalina, pero no con fosfodiesterasa (Mérida *et al.*, 1991b). Por otra parte, experimentos de marcaje radiactivo *in vivo* para intentar determinar ^{32}P unido a la GS inactiva, sometida a electroforesis desnaturante, han sido hasta la fecha infructuosos (Mérida *et al.*, 1991a). Todos estos resultados sugieren una modificación no covalente de la enzima y descartan modificaciones del tipo de la adenililación. No obstante la enzima inactiva se puede visualizar por su diferente movilidad en geles no desnaturante de poliacrilamida, y mediante experimentos de entrecruzamiento con un agente químico, el EDAC, se obtienen dos productos de entrecruzamiento, que sugieren la existencia de dos proteínas de 6-7 y 14-18 Kd, que se unen a la GS, para provocar su inactivación (Reyes y Florencio, 1995), actualmente se están purificando y caracterizando dichas proteínas, y determinando su mecanismo de acción.

La GSI de *Synechocystis* puede ser también inactivada por la oscuridad o por la adición de DCMU a un cultivo creciendo en la luz, dicho proceso de inactivación no depende de la luz *per se* sino más bien del estado redox celular. Ambos mecanismos de acción por amonio y el

del estado redox dan lugar a la misma modificación de la GSI (Reyes et al., 1995).

AGRADECIMIENTOS

El trabajo aquí presentado, en lo referente a los experimentos realizados por nuestro grupo, lo han sido gracias a la financiación obtenida de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, PB91-0127, PB94-1444 y PB97-0732, y del Plan Andaluz de Investigación, grupo CVI-0112.

BIBLIOGRAFÍA

- Andriesse, X., G. Van Arkel y P. Weisbeeck. 1990. Cloning of the nitrate reductase gene of *Synechococcus* PCC 7942. Third International Symposium on NO₃- Assimilation: Molecular and Genetic Aspects. Bombanes, Abstracts p. 98.
- Candau, P. 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Chastain C.J., J.S. Brusca, T.S. Ramasubramanian, T.-F. Wei y J.W. Golden. 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.
- Crespo, J.L., M. García-Dominguez, F.J. Florencio. 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.
- Flores, E. y A. Herrero. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. *En* D. A. Bryant, (e.d.), *The molecular Biology of the Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp: 487-517.

- Flores, E., M.G. Guerrero y M. Losada. 1980. Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. Arch. Microbiol. 128:137-144.
- Flores, E., M.G. Guerrero y M. Losada. 1983. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 722:408-416.
- Frías, J.E., A. Mérida, A. Herrero, J. Martín-Nieto y E. Flores. 1993. General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. J. Bacteriol. 175:5710-5713.
- Friga, G. M. y G. L. Farkas, 1981. Isolation and properties of an isocitrate dehydrogenase from *Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. 129, 331-334.
- García-Domínguez, M., J.C. Reyes y F. J. Florencio, 1997. Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 244, 258-264.
- Guerrero, M.G. y C. Lara. 1987. Assimilation of inorganic nitrogen, pp: 163-186. En: P. Fay and C. Van Baalen, (ed.), The Cyanobacteria. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Guerrero, M.G., J.M. Vega y M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. 32:169-204.
- Herrero, A., E. Flores y M.G. Guerrero. 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.
- 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., and 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.
- Lara, C., J.M. Romero y M.G. Guerrero. 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 169:4376-4378.
- Laudenbach, D.E. y A.R. Grossman. 1991. Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. *J. Bacteriol.* 173:2739-2750.
- Lawrie, A.C., G.A. Codd, y D.P. Stewart, 1976. The incorporation of nitrogen into products of photosynthesis in *Anabaena cylindrica* Lemm. *Arch. Microbiol.* 107, 15-24.
- Luque, I., A. Herrero, E. Flores y F. Madueño. 1992. Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol. Gen. Genet.* 232:7-11.
- Luque, I., E. Flores y A. Herrero. 1993. Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant. Mol. Biol.* 21:1201-1205.
- Luque, I., E. Flores y A. Herrero. 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO, J.* 13:2862-2869.
- Manzano, C., P. Candau, C. Gomez-Moreno, A.M. Relimpio y M. Losada. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol. Cell Biochem.* 10:161-169.
- Marqués, S., F.J. Florencio y P. Candau. 1992. Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* 206:69-77.
- Mendez, J.M. y J.M. Vega. 1981. Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Physiol. Plant.* 52:7-14.

- Mérida, A., P. Candau y F.J. Florencio. 1991a. 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.
- Mérida, A., P. Candau y F.J. Florencio. 1991b. *In vitro* reactivation of *in vivo* ammonium-inactivated glutamine synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:780-786.
- Merrick, M. J., y R. A. Edwards. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:604-622.
- Muro-Pastor, M.I. y F.J. Florencio. 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., J. C. Reyes, y F. J. Florencio. 1996. The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178:4070-4076
- Muro-Pastor, M.I., y F.J. Florencio. 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
- Navarro, F., S. Chávez, P. Candau, y F.J. Florencio. 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: 753-757.
- Neuer, G., H. Papen, H. Bothe, 1983. Heterocyst biochemistry and differentiation. En *Photosynthetic prokaryotes*. (Papageorgiou, G.C. y Packer, L., eds), Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford pp: 219-242.
- Ohmori, M., K. Ohmori y H. Strotmann. 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 114:225-229.

- Omata, T., X. Andriesse y A. Hirano. 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* 236:193-202.
- Orr, J. y R. Haselkorn. 1982. Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 152:626-635.
- Papen, H., G. Neuer, M. Refaian, y H. Bothe. 1983. The isocitrate dehydrogenase in cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 134, 73-79.
- Pearce, J., C.K. Leach y N.G. Carr. 1969. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 55:371-378.
- Ramasubramanian, T.S., T.-F. Wei y J.W. Golden. 1994. Two *Anabaena* sp. strain PCC7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J. Bacteriol.* 176: 1214-1223.
- Reyes, J.C. y F.J. Florencio. 1994a. A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* 176:1260-1267.
- Reyes, J.C., F.J. Florencio. 1994b. A mutant lacking the glutamine synthetase gene (*glnA*) is impaired on the regulation of the nitrate assimilation system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 176: 7516-7523.
- Reyes, J.C., F.J. Florencio. 1995a. Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol.* 27: 789-799.
- Reyes, J.C., F.J. Florencio. 1995b. A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. Involvement of a inactivating protein. *FEBS Lett* 367: 45-48.

- Reyes, J.C., J.L. Crespo., M. Garcia-Dominguez, y F.J. Florencio. 1995c.. Electron transport cocntrols glutamine synthetase activity in the facultative heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 109: 899-905.
- 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.
- Rodriguez, R., C. Lara y M.G. Guerrero. 1992. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem. J.* 282:639-643.
- Rowell, P., M.J.A.M. Sampaio, J.K. Ladha y W.D.P. Stewart. 1979. Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity in vivo in response to light and NH_4^+ . *Arch. Microbiol.* 120:195-200.
- Schmitz, S., Navarro, F., Kutzki, C., Florencio, F. J. y Böhme, H. 1996. Glutamate 94 of the [2Fe-2S]-ferredoxins is important for efficient electron transfer in the 1:1 complex formed with ferredoxin glutamate synthase (GltS) from *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 21-25
- Smith, A.J. 1982. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En *The biology of cyanobacteria* (N. G. Carr y B. A. Whitton, eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford pp. 47-85.
- Southern, J. A., J. R. Parker, y D. R. Woods. 1987. Novel structure properties and inactivation of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 133:2437-2446.
- Stanier, R.Y. y G. Cohen-Bazire. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Anñ. Rev. Microbiol.* 31:225-274.
- Suzuki, I., T. Sugiyama y T. Omata. 1993. Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 34:1311-1320.

- Tuli, R. y J. Thomas. 1981. In vivo regulation of glutamine syntetase by ammonium in the cyanobacterium *Anabaena* L-31. Arch. Biochem. Biophys. 206:181-189.
- Vega-Palas, M.A., E. Flores y A. Herrero. 1992. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belong to the Crp family of bacterial regulators. Mol. Microbiol. 6:1853-1859.
- Wei, T.-F., T.S. Ramasubramanian, F. Pu y J.W. Golden. 1993. *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by in vivo transcriptional interference selection. J. Bacteriol. 175:4025-4035.