

Trabajo especial I: Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias formadoras de heterocistos



Bach. M^a Cecilia Callejas
Orientadora: Dra Silvia Batista
Realizado en el Dpto. Bioquímica del IIBCE,
Unidad Asociada a Fac. de Ciencias.
Montevideo, mayo 2007

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutora, Silvia Batista por guiarme en vez de moldearme, por acompañarme y por confiar en mí durante la elaboración de este trabajo y a Paul Gill por plantearme una interrogante que contestar.

También quisiera agradecerles a todas las personas que de alguna forma u otra me apoyaron y alentaron en esta empresa; a mis compañeras de laboratorio Ana Inés Catalán, María Morel, Martha Ubalde, Cecilia Martínez y Susana Castro. A Elena y su *troupe*: Vane, Fede R., Rufo, Dani, Ceci T., a toda le gente de Ecología Microbiana Alicia, Nati, Gastón, Leti, Pati, Ma. Lis. Uriel y Ceci R.

Agradezco a mis queridas amigas Alicia y Magui por alentarme y por brindarme gran parte de los artículos que cito en este trabajo. Y finalmente agradezco a mi familia y a Antonio, sin los cuales hubiese sido imposible llegar hasta donde estoy hoy. A todos, muchas gracias.

Índice

Índice	1
Resumen	3
Capítulo 1: Cianobacterias	5
1.1 Estructura celular	8
1.1.1 <i>Protoplasma</i>	8
1.1.2 <i>Membranas y aparato fotosintético</i>	10
1.1.3 <i>Ficobilisomas y ficobiliproteínas</i>	11
1.2 Pared celular	13
1.2.1 <i>Envoltura y membranas externas</i>	13
1.2.2 <i>Capa o envoltura superficial</i>	16
1.3 Sistemática de las cianobacterias	17
1.3.1 <i>Clasificación según criterios bacteriológicos</i>	18
1.3.2 <i>Clasificación según criterios botánicos</i>	18
1.3.3 <i>Criterios actuales para la clasificación</i>	19
1.4 Metabolismo	21
Capítulo 2: Cianobacterias diazotrofas	23
2.1 El complejo nitrogenasa	23
2.1.1 <i>Estructura</i>	24
2.1.2 <i>Clasificación</i>	25
2.1.3 <i>Evolución de las nitrogenasas</i>	26
2.2 Clasificación de las cianobacterias diazotrofas	27
2.2.1 <i>Cianobacterias sin especialización celular</i>	27
2.2.2 <i>Cianobacterias con especialización celular</i>	28
2.3 Moléculas señal en cianobacterias filamentosas con heterocistos	29
2.3.1 <i>2-oxoglutarato (2-OG)</i>	29
2.3.2 <i>Ión Calcio</i>	31
2.3.3 <i>Factores σ</i>	32
2.3.4 <i>Proteína P_{II}</i>	33

Capítulo 3: El Heterocisto	36
3.1 Estructura del heterocisto	37
3.1.1 <i>Protoplasma</i>	37
3.1.2 <i>Pared celular</i>	37
3.2 Metabolismo del heterocisto	39
3.3 Protección del complejo nitrogenasa del O₂	41
3.4 Diferenciación del heterocisto	42
3.4.1 <i>Señales que inducen la diferenciación</i>	42
3.4.2 <i>Estadios de desarrollo</i>	43
3.4.3 <i>Eventos moleculares involucrados en el programa de diferenciación</i>	44
3.5 Genes más relevantes durante la diferenciación	46
<i>hanA</i>	46
<i>hepA</i>	46
<i>hepK</i>	46
<i>hetR</i>	47
<i>hetF</i>	48
<i>hetC</i> y <i>hetL</i>	48
<i>hetN</i>	48
<i>ntcA</i>	48
<i>patA</i>	49
<i>patB</i>	49
<i>patS</i>	50
<i>Otros genes pat</i>	50
Capítulo 4: Metabolismo del N en cianobacterias	51
4.1 Rutas de asimilación de N	51
4.1.1 <i>Asimilación de nitrato y nitrito</i>	52
4.1.2 <i>Fijación de nitrógeno</i>	53
4.1.3 <i>Asimilación de urea y degradación de cianato</i>	53
4.1.4 <i>Incorporación de amonio</i>	54
4.1.5 <i>Incorporación de aminoácidos</i>	55
4.2 Regulación del metabolismo nitrogenado	56
4.2.1 <i>Regulación transcripcional</i>	57
4.2.2 <i>Regulación postraducciona</i>	58
Conclusiones	60
Bibliografía	65

Resumen

El nitrógeno (N) forma parte de la estructura de los aminoácidos y ácidos nucleicos y esta característica lo convierte en un elemento esencial para la vida. La mayor reserva de este elemento se encuentra en la atmósfera, en una forma diatómica relativamente inerte (N₂), no asimilable por la mayor parte de los organismos vivos.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) representa la principal fuente de transformación química del nitrógeno atmosférico a una forma disponible biológicamente. Este proceso puede ser efectuado únicamente por organismos procariotas en condiciones de vida libre o en simbiosis. Los organismos capaces de realizar la FBN se denominan en su conjunto como *diazotrofos*. Dentro de este grupo particular de procariotas se encuentran algunas especies de cianobacterias que participan en el ciclo biogeoquímico del elemento, aportando N asimilable a la biosfera.

Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos procariotas muy antiguos con amplia distribución ecológica. Podrían haber surgido hace unos 3500 millones de años y la teoría endosimbiótica los propone como precursores de los cloroplastos. Si bien las cianobacterias son un grupo monofilético, exhiben una gran diversidad morfológica. Pueden encontrarse en ambientes tan extremos como los polos o los géiseres o tan comunes como los océanos, cursos de agua dulce o efluentes de residuos industriales.

En la actualidad se dispone de las secuencias completas de los genomas de *Synechocystis* PCC6803, *Anabaena* PCC7120, *Anabaena variabilis* ATCC29413, *Nostoc punctiforme* ATCC29133, *Prochlorococcus marinus* MED4 y *Synechococcus* WH8102 y otros proyectos genoma como los de *Gloeobacter violaceus* PCC7421, *Nostoc punctiforme*, *Trichodesmium erythraem*, *Synechococcus* PCC7002, *Synechococcus* PCC 6301 y *Synechococcus* PCC7942, están en proceso de culminación.

Históricamente, el interés científico por las cianobacterias ha estado restringido a determinados grupos de investigación. Los conocimientos acerca del metabolismo y la ecología de estos organismos son parcialmente comprendidos y sólo se han estudiado algunos aspectos de los mismos. Particularmente, la información existente acerca de las cianobacterias formadoras de heterocistos es escasa y se encuentra dispersa. Por esto he pretendido compilar parte de la información disponible actualmente acerca de las cianobacterias diazotrofas, con especial atención en las formadoras de heterocistos.

He realizado la búsqueda bibliográfica en base a artículos *on line* recientes, publicados en revistas de divulgación científica y he organizado dicha información con un criterio arbitrario, de acuerdo al proceso que he ido experimentando durante mi conocimiento acerca del tema. Este trabajo comienza describiendo los aspectos más generales de estos organismos y continúa con otros más complejos y específicos, como algunos de los mecanismos moleculares que intervienen en el programa de diferenciación celular del heterocisto. Finalmente, describo algunos de los mecanismos que regulan el metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias que forman filamentos.

Capítulo 1

Cianobacterias

Las cianobacterias constituyen el grupo de procariotas fotosintéticos más grande, diverso y distribuido del planeta. Estos organismos son capaces de llevar a cabo los procesos de fotosíntesis oxigénica y respiración en el mismo compartimiento simultáneamente. Esta singular característica les permite

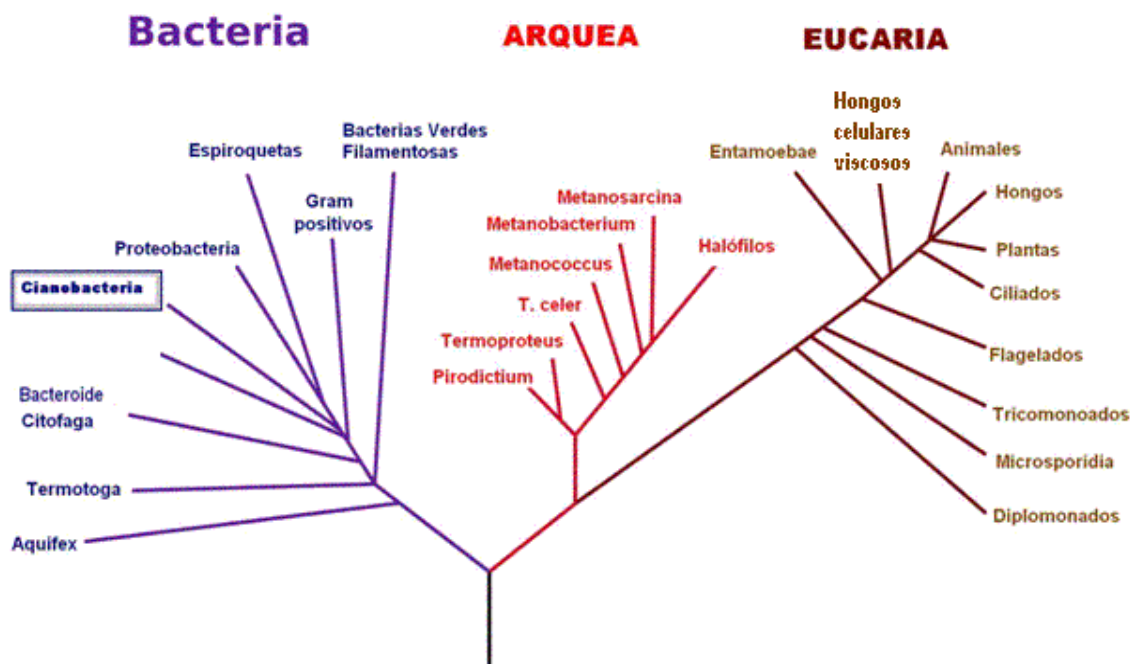


Figura 1. Árbol de la vida basado en las relaciones filogenéticas de los genes 16S de ARNr entre los distintos organismos. Se pueden observar los tres grandes Dominios: Bacteria, Arquea y Eucaria. El grupo de Cianobacterias se encuentra destacado. *Extraído de:* <http://www.wikipedia.org>

sobrevivir y prosperar en un amplio rango de condiciones ambientales (Vermaas, 2001). Pueden definirse como organismos procariotas con un aparato fotosintético

muy similar a nivel molecular, funcional y estructural al contenido en los cloroplastos de células eucariotas (Stanier y Cohen Bazire, 1977).

La principal diferencia entre las bacterias fotosintéticas y las cianobacterias se basa en el tipo de pigmentos fotosensibles que producen. Las cianobacterias contienen *clorofila a* al igual que las algas eucariotas y las plantas verdes. Las moléculas de agua sirven como donadoras de electrones y debido a la fotólisis de éstas, se genera oxígeno como producto. El resto de las bacterias fotosintéticas contienen *bacterioclorofila a* o *b* (bacterias púrpuras), mientras que las bacterias verdes contienen *bacterioclorofila c* o *d* (Moat y col., 2002). Los pigmentos cosechadores de luz como las ficobiliproteínas son similares a los de las rodofitas o algas rojas (Stanier y Cohen Bazire, 1977).

Las cianobacterias además, representan una de las líneas filogenéticas principales en el árbol de la vida (Fig. 1) y muestran un parentesco lejano con las bacterias (Madigan y col., 1999).

Algunos de estos organismos poseen la capacidad de vivir de forma mutualista y en asociaciones simbióticas con una amplia variedad de organismos eucariotas, incluyendo plantas tales como briofitas, cycadas y angiospermas (Rai y Bergman, 2000) o formar parte de matas microbianas compactas, con una



Figura. 2 Algunas cianobacterias: A) *Oscillatoria*, especie filamentosamente comúnmente encontrada en agua dulce y géiseres; B) *Nostoc*, especie que suele desarrollar vainas; C) *Anabaena*, especie filamentosamente, en la foto se puede observar un heterocisto (tercer célula desde la derecha) y un acinet (célula grande brillante); D) *Synechococcus*, especie unicelular que puede encontrarse en *habitats* marinos y géiseres. Este es el procarionta fotosintético más importante de los *habitats* marinos, estimándose que sería responsable de hasta un 25% de la producción primaria del planeta. *Adaptado de:* <http://textbookofbacteriology.net/procarvototes.html>.

estratificación vertical característica, conteniendo grupos microbianos funcionalmente distintos (Howard-Williams y Vincent, 1990; Paerl y Steppe, 2000).

Este grupo ubicuo de procariotas exhibe una diversidad citomorfológica y fisiológica muy amplia (Fig. 2), habiéndose descrito básicamente formas unicelulares, filamentosas o en colonias. Las formas unicelulares, por ejemplo dentro del orden *Chroococales*, se caracterizan por poseer células cilíndricas, ovoides u esféricas. Pueden encontrarse células únicas que se separan luego de la fisión binaria o agregadas, formando colonias irregulares, en las cuales una matriz de naturaleza viscosa es secretada por las células durante el crecimiento de la colonia (Mur y Utkilen, 1999).

A través de una serie de divisiones celulares más o menos regulares, combinada con la formación de una vaina, se pueden producir colonias más ordenadas. La morfología filamentosas es el resultado de divisiones celulares repetidas en un mismo plano, sucediéndose en ángulos rectos al eje principal del filamento (Fig. 3) (Mur y Utkilen, 1999). Como resultado se produce una hilera de células contiguas denominada *tricoma*, que puede ser recto o enrollado (Thajuddin y Subramanian, 2005). Cuando el tricoma se encuentra recubierto por una vaina se denomina *filamento*.

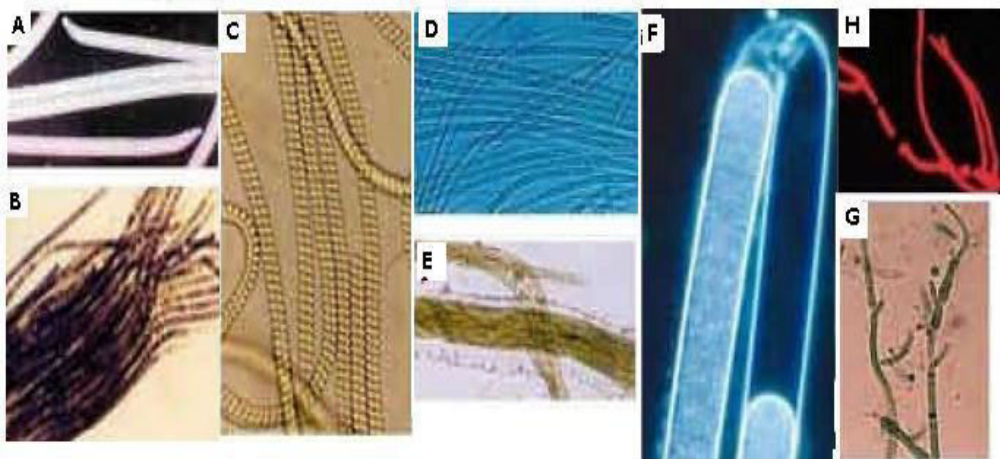


Figura. 3. Los tricomas pueden organizarse en formas simples rectas (A) o formar agregados (B) y/o espirales (C). El tricoma con la vaina que lo envuelve se denomina filamento (D, E). En algunas formas, los tricomas son envueltos por el mismo filamento (F). Pueden ser ramificados con las células organizadas en arreglos uniseriados o multiseriados (G). Además de las ramificaciones verdaderas, también existen formas ramificadas falsas (H). *Adaptado de Thajuddin, 2005.*

Algunos filamentos pueden desarrollar heterocistos (células especializadas en fijar o reducir el N_2), acinetos para sobrevivir en condiciones adversas como el frío o la desecación u hormogonios para la taxis. (Rai y Bergman, 2000).

Aproximadamente el 50% de las cianobacterias estudiadas son organismos fotoheterótrofos facultativos capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono y luz como fuente de energía. Se estima que aproximadamente el 20% son capaces de crecer como quimioheterótrofos en la oscuridad, cuando la fuente de energía y carbono proviene de compuestos orgánicos. Algunas cianobacterias también son capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica en la cual otras moléculas distintas al agua (ácido sulfhídrico o hidrógeno molecular) proporcionan como moléculas donadoras de electrones (Adams y Duggan, 1999).

1.1 Estructura celular

La organización celular básica se caracteriza por la presencia de membranas intracelulares profusas denominadas tilacoides y por un citoplasma con variedad de inclusiones granulares con distinta composición y función.

1.1.1 Protoplasma

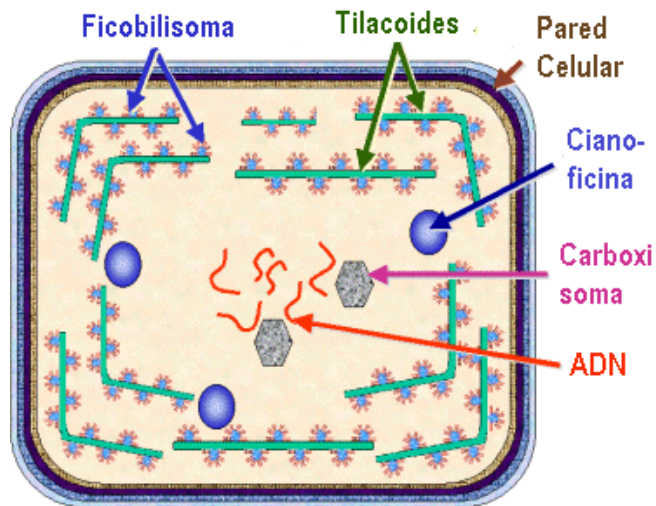


Figura 4. Diagrama de una célula de cianobacteria donde se representan estructuras y organelos característicos de estos organismos. Adaptado de: <http://hypnea.botany.uwc.ac.za/phylogeny/classif/cyan2.htm>

Al igual que otros organismos procariontes, las cianobacterias carecen de organelos tales como mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, ni tampoco presentan vacuolas unidas al tonoplasto. En cambio, pueden encontrarse gránulos de polifosfato o carboxisomas (también conocidos como cuerpos poliédricos) que cumplen la función de reserva

de la enzima Rubisco o gránulos de poli β-hidroxi butirato (Fig. 4) (van den Hoek y col., 1995).

Los pigmentos se encuentran concentrados en la parte más externa del protoplasma, denominada *cromatoplasma*. Este a su vez se ensambla con el *centroplasma*, que se define como la región más interna que contiene el material genético. La región del centroplasma que ocupa el ADN se denomina *nucleoplasma* (Wolk, 1973).

El material de reserva más importante de carbono (C) es un glucano con unidades de glucosa conectadas mediante enlaces β -1,4 -*almidón cianoficiano*- el cual es muy similar al glucógeno y a la fracción de amilopectina del almidón encontrado en las plantas superiores. Este poliglucano es almacenado en gránulos entre los tilacoides (van den Hoek y col. , 1995).

La cianoficina es otro biopolímero que se acumula en forma de gránulos en el protoplasma de las cianobacterias (Fig. 4). A diferencia de los gránulos de almidón, los gránulos de cianoficina son visibles mediante microscopio óptico y pueden identificarse por sus formas angulares (van den Hoek y col., 1995). Estos se acumulan cerca de las paredes celulares o en los espacios entre el centroplasma y el cromatoplasma (Sherman y Sherman, 2000).

La cianoficina representaría el material de reserva de N en algunas especies de cianobacterias. Está compuesto por un esqueleto lineal de residuos Asp al cual se unen residuos de Arg a través de enlaces amida entre el grupo α -amino de la Arg y β -carboxilo del residuo Asp (Sherman y Sherman, 2000). Es un polímero aminoacídico de origen no ribosomal (*non ribosomal polipeptide o NRP*). Esto significa que se sintetiza sin la participación de ribosomas y que los residuos aminoacídicos son incorporados enzimáticamente mediante la participación de la cianoficina sintetasa (Berg y col., 2000).

En el heterocisto la cianoficina se acumula en los polos celulares adyacentes a las células vegetativas vecinas. Las actividades de las enzimas necesarias para su síntesis y degradación, la cianoficina sintetasa y la cianoficinasa, son 30 a 70 veces superiores a las determinadas en células vegetativas (Picossi y col., 2004).

En las cianobacterias que separan temporalmente la fijación de N_2 y la fotosíntesis, este polímero se considera como una reserva dinámica de nitrógeno. Dichos organismos degradan la cianoficina durante el período de luz y la sintetizan durante el período de oscuridad, cuando se produce la FBN (Picossi y col., 2004).

1.1.2 Membranas y aparato fotosintético

La *membrana tilacoidal* o *tilacoide* contiene las enzimas involucradas en las cadenas de transporte de electrones para los procesos de fotosíntesis y respiración, mientras que la *membrana citoplasmática* contiene únicamente los componentes para el proceso de respiración. En la membrana tilacoidal ambas cadenas se solapan y utilizan en común algunos componentes, como el *pool* de plastoquinonas (PQ), el complejo de citocromo b_6f y los sistemas solubles del lumen que actúan como transportadores de electrones (Vermaas, 2001).

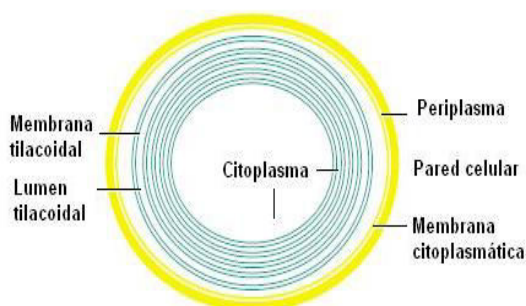


Figura 5. Bosquejo de las membranas y compartimientos en una célula de cianobacteria. La membrana citoplasmática separa el citoplasma del periplasma; en esta membrana se desarrolla el proceso de respiración pero no el de fotosíntesis. El color amarillo refiere a la presencia de compuestos carotenoides. Las membranas tilacoides contienen componentes proteicos que catalizan los procesos de respiración y fotosíntesis, el color verde simboliza la presencia de clorofila. *Adaptado de: Vermaas, 2001.*

Los tilacoides de las cianobacterias se organizan de modo tal que recuerdan la forma de una vasija, las membranas se disponen de a pares y cada uno de estos está envuelto por el siguiente, al estilo de las *muñecas rusas* (Fig. 5). El espacio entre cada par de membranas tilacoidales se denomina *lumen tilacoidal*. En este espacio los protones son acumulados como producto del transporte de electrones y generan el gradiente empleado en la síntesis de ATP. El espacio entre dos pares de membranas tilacoidales es continuo con el citoplasma de la célula (Vermaas, 2001).

En algunas ocasiones se pueden observar configuraciones reticuladas, siendo el plano que las contiene paralelo u ortogonal a la superficie celular. Aunque los tilacoides se observan usualmente como múltiples estructuras discretas, también se ha observado la presencia de una única membrana tilacoidal periférica o rodeando el centroplasma (Wolk, 1973).

A diferencia de los organismos fotosintéticos eucariotas, los tilacoides de las cianobacterias se encuentran libres en el citoplasma y separados de forma equidistante, en vez de apilarse dentro de los cloroplastos (van den Hoek y col, 1995). En estos se encuentran insertos los pigmentos fotosintéticos, principalmente la clorofila *a*, que junto con los pigmentos accesorios constituyen el aparato fotosintético de la célula.

1.1.3 Ficobilisomas y ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas representan los principales pigmentos accesorios y son las moléculas responsables del color de las cianobacterias (Fay, 1992). Dichos colores son el resultado de la absorción de luz por cromóforos tetrapirrólicos lineales asociados covalentemente a las apoproteínas (Grossman y col., 2001).

Estas cromoproteínas pueden representar hasta un 30% de las proteínas totales de la célula, se encuentran compuestas por heterodímeros (subunidades α y β) que se asocian para formar trímeros $(\alpha\beta)_3$ o hexámeros $(\alpha\beta)_6$ (Grossman y col., 2001). Las más abundantes son la *ficocianina* que absorbe luz a una longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de 620nm, la *aloficocianina* con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 650nm y la *ficoeritrina* que absorbe luz a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 565nm (Fig. 6) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Otra característica del aparato fotosintético -que comparten con los cloroplastos de las rodofitas- es la localización extratilacoidal de las ficobiliproteínas (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

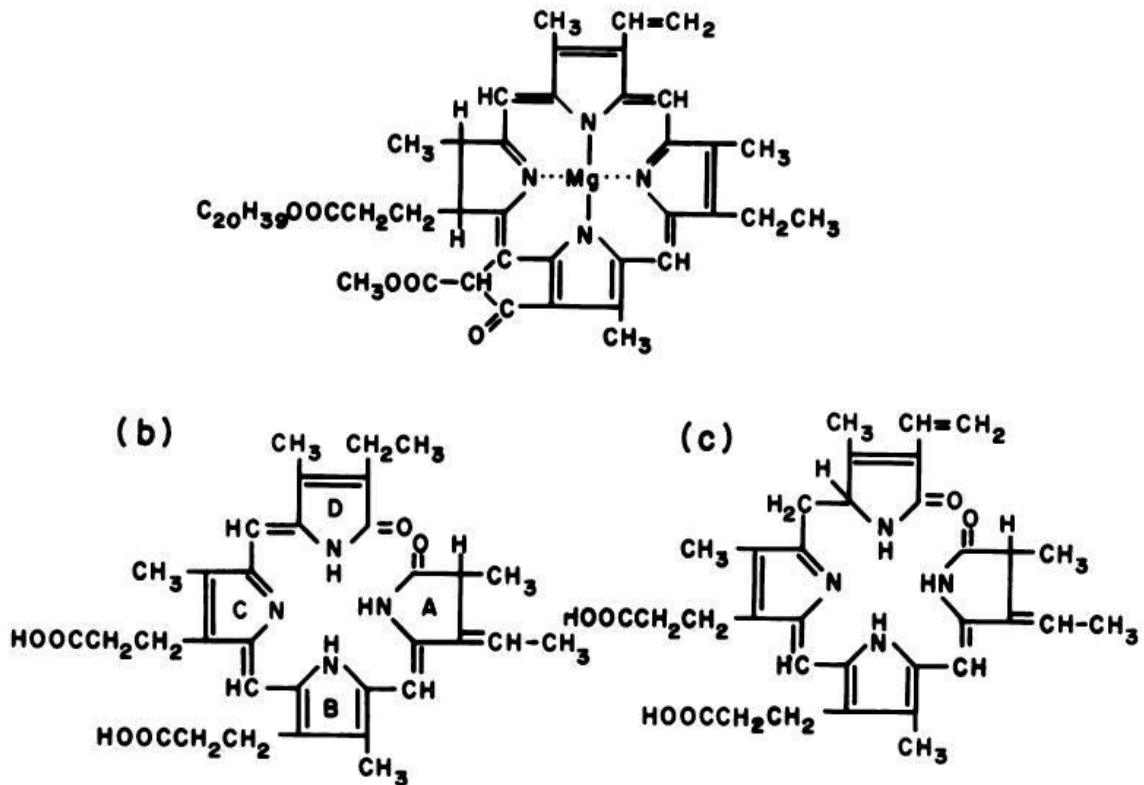


Figura 6. Pigmentos tetrapirrólicos de las cianobacterias. a) Clorofila a; b) ficocianina, c) ficoeritrina. Adaptado de Wolk, 1973.

Las ficobiliproteínas se encuentran contenidas en *ficobilisomas*, los cuales se anclan a las membranas externas de los tilacoides. Los ficobilisomas pueden visualizarse como cuerpos discoidales de aproximadamente 40nm de diámetro, dispuestos en hileras, separando tilacoides adyacentes (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Estos complejos proteicos periféricos de membrana captan la energía lumínica eficientemente y la transfieren a los centros de reacción fotosintéticos. Como se muestra en la figura 7, los ficobilisomas se organizan en dos dominios estructurales, denominados núcleo y bastones. Los polipéptidos L facilitan el ensamblaje de los agregados de ficobiliproteínas y modulan las características de absorción de éstas, promoviendo el flujo de energía unidireccional hacia los centros de reacción (Grossman y col., 2001).

La energía de excitación es transferida desde la ficoeritrina a la clorofila en los centros de reacción a través de la ficocianina y la aloficocianina. Las ficobiliproteínas pueden encontrarse en muy altas concentraciones y quizás sirvan como reserva de proteínas, son solubles en agua y se disocian fácilmente de la membrana tilacoidal (Fay, 1992).

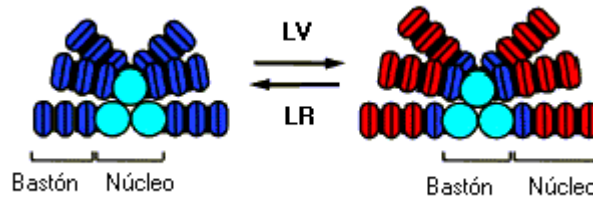


Figura 7. Estructura de ficobilisomas de cianobacterias irradiados con luz verde (LV) o roja (LR). Cada disco en los bastones representa un hexámero de ficobiliproteínas. Los discos rojos representan la ficoeritrina y los azules la ficocianina. *Adaptado de: Grossman y col., 2001.*

Estudios recientes sugieren que los ficobilisomas poseerían un mecanismo alternativo para disipar el exceso de energía absorbida. Este mecanismo fotoprotector se caracterizaría por un efecto de *quenching* mediante el cual se produce la fluorescencia inducida por luz azul de un carotenoide asociado a una proteína soluble (*Orange Carotenoid Protein, OCP*). Esta proteína soluble, codificada por el gen *slr1963* en *Synechocystis* PCC 6803, interactuaría con los tilacoides y actuaría tanto como fotorreceptor así como mediador en la reducción de la cantidad de energía transferida desde los ficobilisomas hasta los fotosistemas (Eckardt, 2006; Wilson y col., 2006).

1.2 Pared celular

A pesar de ser organismos del tipo Gram negativo (-), presentan muchas características típicas de los organismos Gram positivos (+), como el espesor de la capa de peptidoglicano, el grado de entrecruzamiento y la presencia de polisacáridos unidos covalentemente al mismo. La pared celular está constituida por dos membranas: la citoplasmática y la externa (lipopolisacárido), separadas por una capa electrón-densa de peptidoglicano (Hoiczky y Hansel, 2000).

1.2.1 Envoltura y membrana externas

A pesar de su estructura Gram (-), la capa de peptidoglicano en las cianobacterias es considerablemente más gruesa (Fig. 8). El análisis químico de los peptidoglicanos de *Synechocystis* sp. PCC6714 ha revelado que el grado de entrecruzamiento entre las cadenas de peptidoglicanos es muy superior al descrito para bacterias Gram (-) y de hecho es más similar a los valores determinados en las Gram (+) (Hoiczky y Hansel, 2000).

Por otra parte, la mayoría de los pentapéptidos que participan del entrecruzamiento contienen el aminoácido ácido *meso*-diaminopimélico, típico de las bacterias Gram (-), en contraste con el ácido L-diaminopimélico o L-lisina presentes en los tetrapéptidos de los peptidoglicanos de las bacterias Gram (+). Otro constituyente típico de los peptidoglicanos, el ácido teicoico, también se encuentra ausente en la pared celular de las cianobacterias (Hoiczky y Hansel, 2000).

Sin embargo, los peptidoglicanos de las cianobacterias se encuentran asociados en forma de complejos con polisacáridos específicos de un modo muy similar a la organización presente en bacterias Gram (+). La capa de lipopolisacárido (LPS) también contiene algunas características típicas de los organismos Gram (-), como la baja cantidad de enlaces fosfato y la ausencia del componente cetodoxioctonato (Hoiczky y Hansel, 2000).

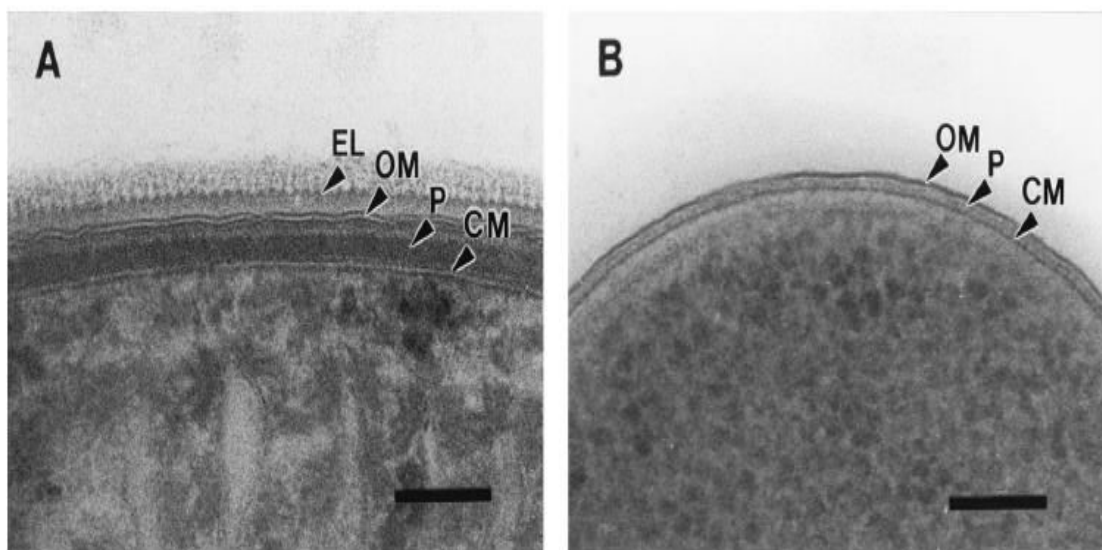


Figura 8. Comparación de micrografías electrónicas de las envolturas celulares de la cianobacteria *Phormidium uncatum* (A) y *Escherichia coli* (B). Ambas bacterias han sido procesadas mediante criosustitución. Nótese la combinación de características Gram positivas y Gram negativas presentes en la pared celular de la cianobacteria, como el grosor de la capa de peptidoglicano y la membrana externa. CM: membrana citoplasmática, EL: capa externa, OM: membrana externa, P: capa de peptidoglicano. Barras, 100nm. Adaptado de Hoiczky y Hansel, 2000.

Además, en las membranas externas se encuentran presentes algunos ácidos grasos poco comunes en las bacterias Gram (-) como el ácido β -hidroxi palmítico (Hoiczky y Hansel, 2000).

Otro grupo de moléculas presentes en la pared celular de las cianobacterias pero poco frecuente en los organismos Gram (-), es el repertorio

de compuestos carotenoides específico de cada especie. En la membrana de la envoltura externa de los cloroplastos también se encuentra presente el mismo tipo de compuestos carotenoides, lo que apoya la hipótesis de que la envoltura del plástido sería otra reliquia de un evento endocítico que promovió el desarrollo de dicho organelo (Hoiczky y Hansel, 2000).

Se ha sugerido que los compuestos carotenoides de las cianobacterias tendrían una función de protección contra las altas intensidades de luz, particularmente en el rango UV. De todos modos, éstas no serían las únicas sustancias fotorreactivas encontradas en la envoltura de las cianobacterias (Hoiczky y Hansel, 2000).

Tabla 1. Resumen de algunas características Gram (+) y Gram (-) de la capa de peptidoglicanos en cianobacterias. *Adaptado de: Hoiczky y Hansel., 2000*

<i>Característica</i>	<i>Gram (+)</i>	<i>Gram (-)</i>	<i>Cianobacteria</i>
% de entrecruzamiento entre las cadenas de peptidoglicano y mureína		20-33%	Gram (+)
Presencia de aminoácidos (aas) en los polipéptidos de entrecruzamiento	ácido <i>L</i> -diaminopimélico, <i>L</i> -lisina, tetrapéptidos	ácido <i>meso</i> -diaminopimélico, pentapéptidos	Gram (-) y Gram (+) (<i>L</i> -lisina)
Presencia de ácido teicoico	si	No	Gram (-)
Presencia de polisacáridos específicos	--	--	Gram (+)

En especies como *Nostoc commune* se identificaron pigmentos aromáticos como la escitonemina (*scytonemin*) o aminoácidos (aas) tipo micosporina (MAAs) que absorben la luz UV de una forma eficiente. Los MAAs son derivados imino-carbonil del cromóforo de ciclohexenona de las micosporinas y tienen conjugado en el anillo sustituyentes nitrogenados (con sustituyentes amino), aminoácidos o sus amino-alcoholes correspondientes: la glicina es el aminoácido más común presente en los MAAs (Korbee y col., 2006). Se ha propuesto que estos

mecanismos de fotoprotección habrían surgido en respuesta a las condiciones presentes en la Tierra hace unos 3500 millones de años (Hoiczky y Hansel, 2000).

1.2.2 Capa o envoltura superficial

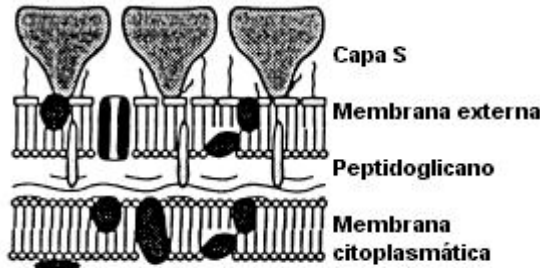


Figura 9. Las capas superficiales (*capas S*) en las eubacterias y cianobacterias Gram (-) se encuentran unidas a la membrana externa por interacciones no covalentes. *Adaptado de: Šmarda y col., 2002*

Las capas superficiales de la pared celular en los procariontes se denominan *capas S* (Fig. 9), están formadas por una red cristalina bidimensional de subunidades proteicas (proteínas y glicoproteínas) idénticas que se auto-ensamblan en un proceso dirigido entrópicamente

(Šmarda y col., 2002). En las cianobacterias, las capas S se han encontrado principalmente en especies unicelulares del género *Chroococcales*, mientras que han sido descritas excepcionalmente en especies filamentosas de los órdenes Nostocales y Stigonematales (Šmarda y col., 2002).

La *capa S* se ubica entre la vaina o capa mucilaginosa y la membrana externa (Fig. 9), con la cual establecen interacciones no covalentes. Participan en los procesos de adhesión y reconocimiento celular, además de actuar como un potente alérgeno (Šmarda y col., 2002).

También pueden cumplir funciones de protección mecánica como cubiertas protectoras, de tamiz molecular y de *trampa* para captar iones y moléculas. Existe poca información acerca de la composición proteica de esta capa, aunque se han descrito dominios para el anclaje de exoenzimas hidrolíticas y porinas (Šmarda y col., 2002).

Finalmente, la capa más externa en la pared celular de las cianobacterias se compone de exopolisacáridos (EPS). Estos organismos producen una amplia variedad de arreglos de EPS que pueden formar, por ejemplo, una vaina unida firmemente a las células, la cual es a menudo fibrilar y a veces cristalina. En otros casos pueden permanecer como polisacáridos liberados al medio extracelular o

también pueden formar una cubierta mucilaginoso, asociada débilmente a las células. Esta misma cubierta mucilaginoso puede formar un tubo en filamentos móviles (Nobles y col., 2001).

Se ha descrito la biosíntesis de celulosa y la presencia de posibles secuencias nucleotídicas que presentan similitud con el gen que codifica para la enzima celulosa sintasa en las cepas *Anabaena* UTEX 2576 y *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. También se describió la presencia de celulosa en tubos mucilaginosos de tricomas móviles, vainas y cubiertas mucilaginosas, de seis cepas pertenecientes a cinco géneros de cianobacterias. De todos modos, el porcentaje de celulosa en estas estructuras sería pequeño en relación al EPS total. Estudios de filogenia del gen *cesA* que codifica para la celulosa sintasa, sugieren que la celulosa sintasa de las plantas vasculares también se habría originado a partir de las cianobacterias (Nobles y col., 2001).

1.3 Sistemática de las cianobacterias

El tipo de fotosíntesis que llevan a cabo la mayoría de estos organismos, junto con su tamaño y su morfología, determinó que fuesen clasificados originalmente como *algas verde azules* (Cyanophyta). De todos modos, luego del descubrimiento de su naturaleza procariota en la década del setenta, el nombre de *cianobacteria* fue más aceptado (Adams y Duggan, 1999).

Desde el año 1979 las cianobacterias se encuentran sujetas a dos sistemas de clasificación: el del Código Botánico del *International Code of Botanical Nomenclature* (Cyanophyta, algas verde azules) y por otro lado el Código Bacteriológico del *International Committee on Systematic Bacteriology* (Oren, 2004).

La sistemática de las cianobacterias es aún tema de discusión entre Botánicos (Cyanophyta) y Bacteriólogos (Cianobacterias), principalmente por la confusión y el desorden que podría generarse al asignar nuevos nombres a taxones ya existentes y reconocibles morfológicamente (Oren, 2004).

1.3.1 Clasificación según criterios bacteriológicos

La clasificación bacteriológica se basa en la información genética y filogenética de las cianobacterias que han podido ser aisladas en cultivos puros (cepas axénicas). Actualmente, el phylum *Cyanobacteria* incluye a los fotótrofos oxigénicos, a los prochlorales que contienen ambos tipos de clorofila (prochlorophyta) y a las cianobacterias (Wacklin, 2006).

Las cianobacterias fueron agrupadas en cuatro sub-secciones, las cuales a su vez fueron divididas en subgrupos y géneros. Aún en la actualidad, las sub-secciones y los géneros se definen principalmente en base a criterios morfológicos. Esto se debe a la carencia de suficientes aislamientos caracterizados genética y fenotípicamente (Wacklin, 2006).

Asimismo, en el año 2002, Cavalier-Smith propuso que la “División *Cyanobacteria*” -una de las ocho *Divisiones* propuestas para los procariotas- estaría compuesta por dos subdivisiones, tres clases y seis ordenes (Tabla 2) (Oren, 2004).

Tabla 2. Nombres de los taxones publicados por la IJSEM/ IJSB o validados en las Listas de Validación de la publicación hasta noviembre del 2003. Todos han sido propuestos por Cavalier-Smith en 2002, excepto los que están marcados, (+) Murray 1984, 1988, (*) Florenzano *et al.*, 1986. *Adaptado de: Oren, 2004*

División	Subdivisión	Clase	Orden
Cyanobacteria	Gloeobacteria	Oxiphotobacteria ⁽⁺⁾	Chroococcales
		Phycobacteria	Gloeobacterales
		Gloeobacteria	Nostocales
		Hormogoneae	Oscillatoriales
			Pleurocapsales
			Prochlorales ^(*)
			Stigonematales

1.3.2 Clasificación según criterios botánicos

De acuerdo con la clasificación morfológica tradicional, este grupo de organismos procariotas fue dividido en cinco subsecciones. Las subsecciones I (Chroococcales) y II (Pleurocapsales) contienen cianobacterias cocoides unicelulares. Las células de la sub-sección I se dividen por fisión binaria, mientras

que las de la subsección II también son capaces de dividirse por fisión múltiple, produciendo células reproductivas pequeñas y fácilmente dispersables llamadas *baecitos* (Tomitani y col., 2006).

Las cianobacterias de las subsecciones III al V forman filamentos que varían en su complejidad morfológica. La subsección III (Oscillatoriales) incluye a los filamentos compuestos exclusivamente por células vegetativas, mientras que en las subsecciones IV (Nostocales) y V (Stigonematales), algunas células vegetativas pueden diferenciarse en heterocistos o acinetos, células morfológica y ultraestructuralmente distintas. Además, las cianobacterias de la subsección V puede presentar patrones de ramificación complejos (Tomitani y col, 2006).

La revisión de la clasificación según el código botánico realizada por Komárek en 1985 agrupó a las cianobacterias (cianoprocariotas) en cuatro órdenes - Nostocales, Stigonematales, Chroococcales y Oscillatoriales- que fueron divididos en familias, subfamilias, géneros y especies (Tabla 2) (Wacklin, 2006). Este sistema de clasificación se basa principalmente en la identificación de las especies directamente en las muestras naturales colectadas sin previo aislamiento, lo cual ha sido usualmente empleado como herramienta para el estudio de la diversidad de cianobacterias por los Ecólogos (Wacklin, 2006).

Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha intentado adoptar un criterio único para la clasificación de estos organismos, respetando la nomenclatura de los Códigos Botánico y Bacteriológico (Komárek, 1990).

1.3.3 Criterios actuales para la clasificación

Actualmente se sugiere que el único método aceptable y recomendable para la evaluación taxonómica moderna de los cianoprocariotas sería a través de un abordaje polifásico, empleando métodos de caracterización fenotípica, ultraestructural, ecológica, bioquímica y molecular (Tabla 3) (Komárek, 1990).

A continuación se presenta una tabla que describe los criterios empleados para la clasificación de las cianobacterias según el Manual Bergey's de

Sistemática Bacteriológica, Komárek y Anagnostidis y Hoffmann, Komárek and Kaštovský.

<p>Clasificación según el Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica (Boone & Castenholz 2001)</p>	<p>Clasificación según Komárek y Anagnostidis (Anagnostidis y Komárek 1985; Komárek y Anagnostidis 1988, 1999, 2005)</p>	<p>Clasificación según Hoffman, Komárek y Kaštovský (2005)</p>
<p>Subsección I: Unicelulares o colonias, división por fisión binaria en 1 o 3 planos o por gemación</p> <p>Subsección II: Unicelulares o colonias, división por fisión múltiple o en combinación con fisión binaria</p>	<p>Chroococcales: Unicelular o colonias</p>	<p>Gloeobacterales: Cocoides, sin tilacoides</p> <p>Synechococcales²: Organizaciones de tilacoides paralelas a la superficie celular, unicelulares o colonias</p> <p>Chroococcales: Organización radial de los tilacoides, unicelulares o colonias</p>
<p>Subsección III: Filamentos sin heterocistos</p>	<p>Oscillatoriales: Filamentos sin heterocistos</p>	<p>Oscillatoriales¹: Organización radial de los tilacoides, filamentos grandes</p> <p>Pseudoanabaenales²: Organizaciones de tilacoides paralelas a la superficie celular, filamentos delgados</p>
<p>Subsección IV: Filamentos con heterocistos, no ramificados</p>	<p>Nostocales: Filamentos con heterocistos, acinetos, ramificaciones falsas</p>	<p>Nostocales: Cianobacterias filamentosas con heterocistos</p>
<p>Subsección V: Filamentos con heterocistos, ramificados</p>	<p>Stigonematales: Filamentos con heterocistos, acinetos, ramificaciones verdaderas</p>	

Tabla 3. Clasificación de las Cianobacterias de acuerdo a los sistemas bacteriológico (Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica) y botánico (Komárek and Anagnostidis; Hoffmann, Komárek and Kaštovský). *Adaptado de: Wacklin, 2006*

1.4 Metabolismo

Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos aerobios que emplean las reacciones de la fotosíntesis oxigénica para dirigir la biosíntesis, a expensas de nutrientes inorgánicos (CO_2 , N_2). Algunas cianobacterias de origen marino tienen como requerimiento esencial para su crecimiento la presencia de vitamina B_{12} ; con esta excepción, no se ha demostrado hasta el momento el requerimiento de ningún otro factor de crecimiento orgánico (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

En general, la ruta primaria de asimilación de carbono es la vía de las pentosas fosfato (ciclo de Calvin-Benson) en la cual participan dos enzimas clave como la fosforibuloquinasa y la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). El transporte de electrones de la cadena respiratoria se localiza aparentemente en la membrana plasmática y también en la membrana tilacoidal, en la cual compartiría algunos componentes con el sistema de transporte de electrones del aparato fotosintético (Fay, 1992).

A su vez, la oxidación de la glucosa 6-fosfato a través de la vía de las pentosas fosfato podría acoplarse con la oxidación del piruvato a través de las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAC). Sin embargo, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no funcionaría como una vía metabólica completa en las cianobacterias, debido a que estos organismos no sintetizan la enzima α -oxoglutarato deshidrogenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Actualmente se propone que el transporte de electrones dentro del *pool* de plastoquinonas, en las membranas de los tilacoides, no se desarrollaría principalmente a partir del NAD(P)H, en vez de esto, el flujo de electrones se debería principalmente a la actividad de la succinato deshidrogenasa. El NAD(P)H se emplearía entonces de forma preferencial en los procesos de fijación de carbono. El corolario de este nuevo concepto es que las cianobacterias son capaces de generar succinato como un intermediario de la cadena respiratoria, logrando de este modo *adquirir o expresar* un ciclo de los ácidos tricarboxílicos *modificado* (Vermaas, 2001).

También son capaces de fotoasimilar el acetato y convertirlo a acetil-CoA; aunque el acetato no es respirado como resultado del bloqueo del TAC a nivel del 2-oxoglutarato. Por esto se considera que el resto de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que son igualmente sintetizadas por las cianobacterias, tienen una función biosintética, por ejemplo, participando en la síntesis de aminoácidos de la familia de la glutamina. Las cianobacterias, al igual que los metilótrofos y los organismos quimiolitótrofos, pertenecen a la categoría de procariotas que poseen un ciclo de los ácidos tricarboxílicos incompleto (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Recientemente se ha demostrado la ausencia del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa en *Synechocystis* PCC 6803, en base al análisis de su secuencia genómica. Sin embargo, también se ha sugerido que este organismo sería capaz de convertir 2-oxoglutarato en succinato, en ausencia del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa tradicional, empleando una vía alternativa (Cooley y col., 2000).

Por otra parte, experimentos en los cuales se utilizaron técnicas de *radiomarcado (radiolabelling)* y ensayos enzimáticos con distintas cepas de cianobacterias, indican que la vía de las pentosas fosfato es la principal pero no la única ruta de catabolismo del glucógeno endógeno para la supervivencia en los períodos de oscuridad. Tampoco sería la única vía de degradación de carbohidratos exógenos, los que a su vez proveen de intermediarios biosintéticos para el crecimiento heterótrofo en la oscuridad. Luego, el NAD(P)H generado en el catabolismo de los carbohidratos aportaría el poder reductor para la fijación de nitrógeno y la respiración en heterocistos y para la respiración de células vegetativas durante la oscuridad (Summers y col., 1995).

Capítulo 2

Cianobacterias diazotrofas

La fijación biológica de N_2 es un proceso que puede ser efectuado exclusivamente por organismos procariotas, aunque sólo algunas especies son capaces reducir el nitrógeno atmosférico a una forma biológicamente útil.

Todos los diazotrofos, incluyendo las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, tienen los mismos requerimientos generales para desarrollar este proceso: ATP como fuente de energía, un mecanismo generador de poder reductor, un ambiente parcialmente anaerobio y la expresión de un complejo enzimático nitrogenasa (Böhme, 1998). La expresión de este complejo enzimático involucra aproximadamente veinte genes (Zehr y Jenkins, 2003) y se encuentra regulada a nivel transcripcional, traduccional, por modificaciones covalentes y moduladores alostéricos (Aparicio-Tejo y col., 2000).

2.1 El complejo nitrogenasa

El complejo enzimático nitrogenasa está codificado por los genes *nif*, muy conservados en la evolución (Zehr y Jenkins, 2003). El conocimiento de la filogénesis de estos genes se ha incrementado significativamente gracias al aumento de las secuencias nucleotídicas disponibles obtenidas a partir de distintos organismos aislados y del ADN purificado de muestras ambientales de diversos orígenes (Raymond y col., 2004).

La información ha sido obtenida principalmente a partir de secuencias del gen *nifH*, pero también a partir de secuencias de los genes *nifD*, *nifK*, *nifE* y *nifN*, menos conservados durante la evolución (Raymond y col., 2004). El gen *nifH* codifica para una de las subunidades estructurales del complejo nitrogenasa (dinitrogenasa reductasa, homodímero γ_2). El banco de secuencias más importante y amplio de los genes *nif* corresponde al de este gen. Por este motivo se lo ha empleado para realizar estudios de evolución de la nitrogenasa y como marcador molecular para identificar organismos (Zehr y col., 2003).

Dentro de los operones *nif* se encuentran agrupados los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* y generalmente otros dos genes adyacentes, *nifE* y *nifN*. Aunque de forma variable, estos genes se ordenan típicamente del siguiente modo: *nifHDKEN*. Las proteínas NifE y NifN poseen una similitud importante con las proteínas NifD y NifK, respectivamente. Se ha sugerido que estas dos proteínas (NifE y NifN) podrían haberse originado a partir de una duplicación ancestral del operón *nifDK* (Raymond y col., 2004). Los genes *nifA* y *nifL* forman otro operón y sus productos tienen una función reguladora, afectando la expresión de los otros genes *nif* (Aparicio-Tejo y col., 2000).

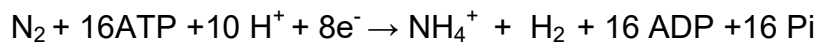
De acuerdo al análisis de las filogenias de *nifH* y del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr (a partir de organismos cultivados), no es posible asegurar la transferencia horizontal de dichos genes. Además, el análisis de similitud entre las secuencias *nifH* sugiere que la nitrogenasa habría evolucionado hace mucho tiempo a partir de un ancestro común (Zehr y col., 2003).

2.1.1 Estructura

Este complejo está compuesto de dos ferrosulfoproteínas. La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) acopla la hidrólisis del ATP con la transferencia de electrones que permiten la reducción del N_2 . Es un homodímero codificado por el gen *nifH*. La Fe-Mo proteína (dinitrogenasa, Componente I) contiene el sitio activo para la reducción de N_2 y está formado por dos heterodímeros $\alpha\beta$. La subunidad α está codificada por el gen *nifD* y la β por *nifK* (Aparicio-Tejo y col., 2000).

Las nitrogenasas *convencionales* contienen molibdeno (Mo) en el centro Fe-S, anclando las subunidades. En la nitrogenasas *alternativas*, el Mo es remplazado por vanadio (V, genes *vnf*) o por hierro (Fe, genes *anf*). Estas enzimas tienen cinéticas de reacción y especificidades distintas y se expresan en determinados organismos sólo cuando la concentración de Mo es limitante (Zehr y col., 2003). Estos complejos enzimáticos alternativos podrían representar nitrogenasas primitivas que se han mantenido en algunos linajes procariontas, en vez de haber derivado como genes parálogos de la nitrogenasa *convencional* (Raymond y col., 2004).

La reacción catalizada por este complejo enzimático es altamente endergónica y metabólicamente costosa. Su estequiometría es:



En condiciones fisiológicas, los electrones (e^-) son utilizados para reducir el N_2 a amonio y en menor cuantía los iones H^+ a H_2 .

La regulación a nivel transcripcional de la fijación de N_2 se da en respuesta a los niveles ambientales de oxígeno y amonio. Debido a que los componentes de la nitrogenasa son lábiles al oxígeno molecular, es ventajoso para la bacteria reprimir la transcripción en presencia de éste. También representa una ventaja reducir la expresión de un sistema metabólicamente costoso como la nitrogenasa, cuando los niveles celulares de nitrógeno fijado son altos. El grado de respuesta a cada estímulo es característico de cada organismo, aunque los diazotrofos de vida libre son especialmente sensibles a los niveles intracelulares de amonio (Halbleib y Ludden, 2000).

2.1.2 Clasificación

El análisis filogenético de las proteínas NifH, NifD y NifK del complejo nitrogenasa ha permitido clasificarlas en cuatro grupos. El grupo I comprende a las *Mo-Fe nitrogenasas*, expresadas principalmente por proteobacterias y cianobacterias.

En el grupo II se encuentran las *Mo-Fe nitrogenasas anaerobias* expresadas por una amplia variedad de organismos anaerobios como clostridios, bacterias acetogénicas y varias metanogénicas. El grupo III contiene las *nitrogenasas alternativas* Mo-independientes codificadas por los genes *anf* y *vnf*. Por último, el grupo IV incluye organismos con genes homólogos a los *nif* pero detectados únicamente en organismos metanogénicos y algunas bacterias fotosintéticas anoxygenicas no caracterizadas aún (Raymond y col., 2004).

2.1.3 Evolución de las nitrogenasas

La función de las nitrogenasas primitivas y las presiones selectivas que participaron en su evolución son actualmente estudiadas y discutidas. Las condiciones atmosféricas de los océanos primitivos y la disponibilidad de trazas de elementos como el Fe, Mo y V en el ambiente, habrían sido factores determinantes de su evolución (Berman-Frank y col., 2003).

En base a modelos físicos de la radiación solar se ha sugerido que la atmósfera primitiva fue medianamente reductora, habiéndose desarrollado un efecto invernadero por la abundancia de metano y dióxido de carbono. En este contexto se han propuesto distintas explicaciones sobre la evolución del complejo enzimático nitrogenasa. Una de las hipótesis plantea que el amonio pudo haber sido abundante inicialmente y las formas primitivas de las nitrogenasas habrían funcionado como enzimas respiratorias (siendo el N₂ una fuente receptora de electrones para los heterótrofos) (Berman-Frank y col., 2003) o como detoxicasas, utilizadas en la detoxificación de cianuros y otras moléculas persistentes en los océanos (Fani y col., 2000).

Otra hipótesis propone que la atmósfera poseía una muy baja concentración de dióxido de carbono (CO₂), limitando la formación de especies NO_x a partir del N₂ y CO₂, y causando así una limitación del N fijado. La fijación biológica de nitrógeno habría sido entonces seleccionada como mecanismo de obtención de N, aproximadamente 3500 millones de años atrás, antes de la oxigenación de la atmósfera y la nitrificación. Luego, el cambio de la atmósfera anóxica a oxigénica pudo haberse producido debido a la fotosíntesis llevada a

cabo por las cianobacterias, en un período comprendido entre 2200 y 2400 millones de años atrás (Fani y col., 2000).

El modelo del *Último Ancestro Común* se basa en la observación de que las nitrogenasas se encuentran presentes en distintas bacterias y arqueas y propone que esta familia de enzimas pudo haber evolucionado a partir del *último ancestro común* de los tres dominios de la vida. Esta hipótesis supone que la pérdida de genes ha sido el factor dominante para explicar la presencia o ausencia de este complejo proteico en los distintos dominios. Otra hipótesis sostiene que los genes de la nitrogenasa evolucionaron a partir de organismos metanogénicos por eventos de duplicación y de transferencia horizontal de dichos genes (Raymond y col., 2004).

2.2 Clasificación de cianobacterias diazotrofas

Las cianobacterias han coevolucionado junto a los distintos estados de oxidación de los océanos y la atmósfera que se sucedieron durante la evolución del planeta y han logrado de esta forma acomodar la maquinaria necesaria para la fotosíntesis oxigénica y la fijación de N₂ en la misma célula o colonia de células (Berman-Frank y col., 2003).

Tradicionalmente han sido distinguidos dos tipos de mecanismos que involucran la separación espacial y temporal de los procesos, pero ésta ha sido una explicación simplista a la evolución de dichos procesos. Estudios recientes revelan un patrón de adaptación más complejo, que puede ser monitoreado ecológica y filogenéticamente (Berman-Frank y col., 2003).

2.2.1 Cianobacterias sin especialización celular

Dentro de las cianobacterias existen algunos miembros en los cuales la capacidad de fijar nitrógeno se perdió durante la evolución o nunca estuvo presente (*Synechococcus*, *Oscillatoria*), otros son capaces de fijar nitrógeno sólo en condiciones microaerobias como *Plectomena* (Misra y Tuli, 2000) o *Phormidium* (Grupo I), mientras que otros pueden efectuar el proceso en condiciones aeróbicas durante los períodos oscuros dentro de ciclos de

luz/oscuridad (Grupo II) (Berman-Frank y col., 2003). Estos organismos fijan el N gaseoso separando temporalmente la fijación del N₂ de la fotosíntesis. Así, durante el día tiene lugar la fotólisis del agua y la formación de ATP y durante la noche se hace posible la fijación de N₂ por la disminución de la pO₂ intracelular, la respiración y la reserva de energía química (Aparicio-Tejo y col., 2000).

2.2.2 Cianobacterias con especialización celular

Existen además otros dos grupos de organismos capaces de desarrollar distintas formas celulares: unas especializadas en desarrollar la fijación de N₂ y otras la fotosíntesis de forma separada y simultánea. El Grupo III incluye sólo dos géneros, *Trichodesmium* y *Katagnymene*, capaces de realizar la fijación de N₂ durante los períodos de luz concentrando la nitrogenasa en un número reducido de células contiguas o tricomas. En el grupo IV se encuentran todas las cianobacterias que forman heterocistos (Fig. 10) y que son por lo tanto capaces la fijar N₂ en condiciones de aerobiosis y en presencia de luz (Berman-Frank y col., 2003).

Muchas cianobacterias pertenecientes a los géneros *Nostocales* y *Stigonematales* desarrollan heterocistos (Holt y col., 1994) a distancias regulares a lo largo del filamento. Los heterocistos son células vegetativas completamente diferenciadas que han perdido la capacidad de dividirse y que mantienen un ambiente microóxico para el óptimo funcionamiento y protección del complejo nitrogenasa (Meeks y Elhai, 2002).

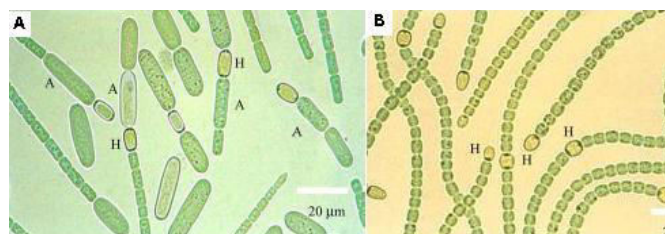
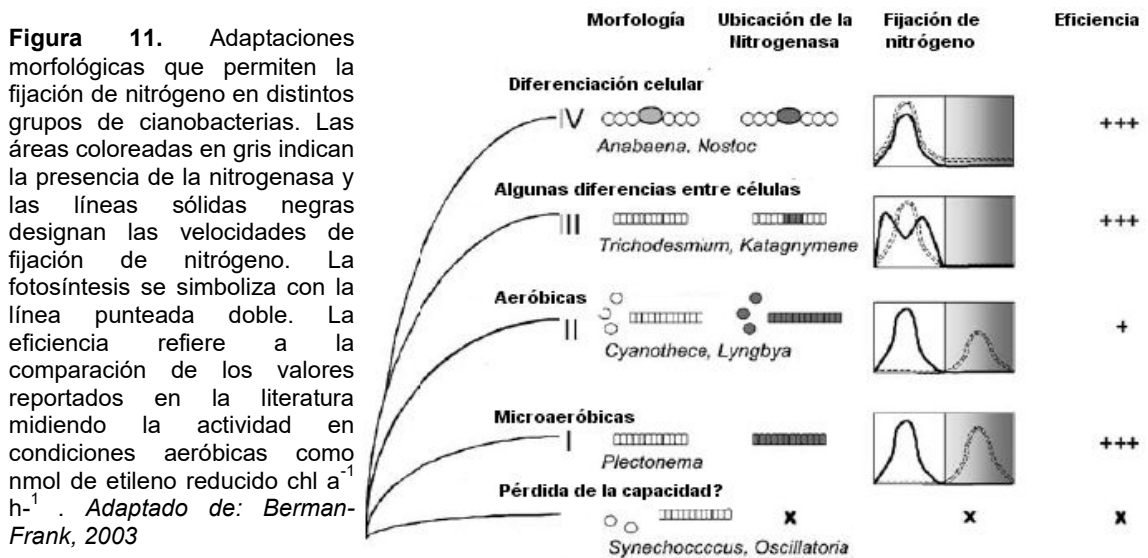


Figura 10. Filamentos de cianobacterias donde se muestran células vegetativas y heterocistos. **A:** *Anabaena cylindrica* (ATCC29414) donde se observan acinetos (A) y heterocistos (H). **B:** cepa 9v aislada de Mkindo (Tanzania) donde se observan heterocistos intercalados y terminales. Adaptado de Herrero y col., 2004

El análisis filogenético del gen *16S ARNr* de 15 géneros distintos de cianobacterias filamentosas sugiere que si bien estos organismos se agrupan

morfológicamente, tendrían orígenes polifiléticos. Por otra parte, los taxones capaces de desarrollar acinetos y heterocistos formarían un grupo monofilético. La monofilia de las subsecciones IV y V (formadoras de heterocistos) fue coherente con el análisis del gen *rbcL* que codifica para la subunidad mayor de la enzima Rubisco, *hetR* que codifica para una proteína esencial para la diferenciación del heterocisto y con los genes *nifH* y *nifD* ya mencionados (Tomitani y col., 2006).

En la figura 11 se muestra esquemáticamente la clasificación de las cianobacterias en los cuatro grupos descritos con algunas características de cada uno, como la morfología de las células o las colonias, la ubicación del complejo nitrogenasa, la distribución temporal de la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis y la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno.



2.3 Moléculas señal en cianobacterias diazotrofas

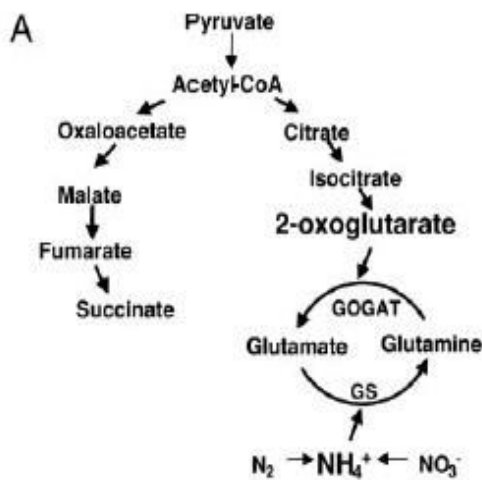
2.3.1 2-oxoglutarato (2-OG)

En el ciclo de los TAC se forma 2-OG por la descarboxilación del isocitrato. Dicha reacción es catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa (codificada por el gen *icd*), luego el 2-OG es descarboxilado

por la enzima 2-OG deshidrogenasa para producir succinil-CoA y continuar el ciclo (Madigan y col., 1993).

En las cianobacterias, el ciclo de los TAC se desarrolla de forma incompleta debido a la ausencia de la enzima 2-OG deshidrogenasa (Fig. 12), por lo que se presume que el 2-OG se utilizaría principalmente para la biosíntesis de glutamato y compuestos derivados del glutamato (Zhang y col., 2006).

Fig. 12. Esquema del ciclo de Krebs incompleto en las cianobacterias. Se destaca la ausencia de la enzima 2-OG deshidrogenasa y la utilización del 2-OG como esqueleto carbonado por la GS-GOGAT, durante la fijación de N. *Adaptado de: Laurent y col., 2005)*



En estos organismos, el 2-OG sería utilizado como esqueleto carbonado para la incorporación de amonio a través del ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). En experimentos en los cuales se indujo la diferenciación de heterocistos en *Anabaena* PCC 7120 a través de la limitación de nitrógeno combinado en el medio, se verificó la acumulación transitoria de 2-OG en las células, sugiriendo que esto podría constituir una señal temprana en el programa de diferenciación celular (Laurent y col., 2005).

Ensayos de incorporación 2-[¹⁴C]OG llevados cabo en una cepa de *Synechococcus*, en la cual se introdujo el gen que codifica para una permeasa heteróloga de 2-OG de *Escherichia coli* (Vázquez-Bermúdez y col., 2000), apoyan la hipótesis propuesta en el párrafo anterior en lo que refiere a la función señalizadora del 2-OG. Las células de *Synechococcus* capaces de expresar dicha permeasa exhibieron la mayor intensidad de señal (moléculas de 2-OG) -y por consiguiente de concentración intracelular- de glutamina y glutamato. Además, el rol predominante del 2-OG como esqueleto carbonado para la asimilación de nitrógeno sugiere que este compuesto sería un sensor del balance C/N en las cianobacterias (Herrero y col., 2001).

El derivado fluorado no metabolizable del 2-OG, el ácido 2,2-difluoropentanedioico (DFPA) ha sido muy útil para estudiar *in vivo* la función de señalización del 2-OG. Este compuesto puede ser incorporado a la célula mediante permeasas heterólogas introducidas por ingeniería genética y debido a la presencia del átomo de ^{19}F , el proceso de su acumulación pudo ser monitoreado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de rotación en ángulo mágico (MAS NMR) (Laurent y col., 2005).

Además, se ha demostrado que la expresión del gen *icd* es mayor en condiciones de estrés por limitación de N en la cepa PCC 6803 de *Synechocystis* sp. o en condiciones de fijación de N_2 en la cepa PCC 7120 de *Anabaena* sp., que en condiciones de no limitación de nitrógeno (Herrero y col., 2001).

2.3.2 Ión Calcio

El rol del Ca^{2+} en las actividades celulares de las bacterias es menos comprendido en comparación con los organismos eucariotas. En algunas bacterias, la concentración intracelular del calcio es regulada estrictamente y existe evidencia de que es de importancia crítica en algunos procesos celulares como la esporulación en *Bacillus*, la quimiotaxis en *E. coli*, y la diferenciación de los heterocistos en cianobacterias. En las cianobacterias que desarrollan heterocistos, el Ca^{2+} libre se acumula en las células durante el proceso de diferenciación y en los heterocistos maduros, por lo que la concentración de este ión parece ser crítica en las primeras etapas del proceso (Torrecilla y col., 2004).

La determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular durante el proceso de diferenciación a heterocisto en una cepa recombinante de *Anabaena* PCC7120 incubada en condiciones de limitación de N, permitió demostrar la existencia de una liberación transitoria de este ión. En dichos experimentos se sugiere que el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} se produciría en el marco de un conjunto de parámetros temporales y cinéticos (Torrecilla y col., 2004). Recientemente se describió en la cepa de *Anabaena* PCC7120 una proteína de unión a calcio denominada CcbP que podría participar regulando el proceso de diferenciación celular a la forma de heterocistos. La sobre-expresión de esta proteína provocó la supresión del desarrollo de heterocistos, mientras que

la ausencia de esta proteína promovió el desarrollo de mutantes formadores de heterocistos contiguos múltiples (fenotipo Mch) (Zhao y col., 2005).

Basándose en estos resultados se ha sugerido que en presencia de suficiente nitrógeno asimilable en el medio, la proteína CcbP se uniría al ión Ca^{2+} intracelular y mantendría una concentración baja de este ión en su forma libre y el complejo CcbP- Ca^{2+} serviría así como reserva de Ca^{2+} . En condiciones de limitación de N combinado, la proteína CcbP se inactivaría por algún mecanismo desconocido especialmente en las células en desarrollo, lo cual provocaría un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y promovería la diferenciación del heterocisto (Zhang y col., 2006).

2.3.3 Factores σ

Las ARN polimerasas de las cianobacterias y de los cloroplastos poseen un núcleo compuesto por cinco subunidades, levemente distinto al núcleo de las polimerasas en otras eubacterias, que poseen un tetrámero ($\alpha_2\beta\beta'$). En el caso de las cianobacterias, este núcleo se compone por las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\gamma$, siendo las subunidades $\beta'\gamma$ correspondientes a las subunidades $\beta'\beta''$ de la polimerasa en otras eubacterias (Muro-Pastor y col., 2001).

La modulación de la actividad de la ARN polimerasa por diversos factores sigma alternativos es un mecanismo bastante común en los procesos de diferenciación celular de algunos organismos procariotas. En cianobacterias, particularmente en la cepa de *Anabaena* PCC 7120, se han identificado al menos siete factores sigma alternativos, incluyendo algunos que sólo se expresan en condiciones de estrés por limitación de N (Muro-Pastor y col., 2001) aunque ninguno es específico de heterocistos, ni esencial para el desarrollo de éstos (Adams y Duggan, 1999).

El factor sigma más importante descrito en *Anabaena* PCC 7120, está codificado por el gen *sigA* y es expresado en filamentos durante el crecimiento en presencia y ausencia de N combinado en el medio. Los genes *sigB* y *sigC* también codifican para factores sigma, pero se expresan transitoriamente luego

de la remoción de N combinado en el medio. Estos últimos no son considerados esenciales para el desarrollo del heterocisto o la fijación de N (Golden y Yoon, 2003).

Recientemente se han clonado y caracterizado otros tres genes que codifican para factores sigma alternativos. La inactivación de los genes *sigD*, *sigE* o *sigF* por inserción de elementos genéticos mediante técnicas recombinantes no afectó el crecimiento de los mutantes en presencia de nitrato, ni el proceso de diferenciación de los heterocistos. Los mutantes dobles *sigD sigE* pudieron diferenciarse en la forma de pro-heterocistos pero fueron incapaces de crecer de forma diazotrofa debido a la fragmentación exhaustiva de los filamentos (Golden y Yoon, 2003).

2.3.4 Proteína P_{II}

La proteína P_{II} (Fig. 13) se considera como una de las moléculas señal más conservada entre los procariontes y todas las proteínas similares a P_{II} identificadas hasta el momento participan en la señalización de metabolismo del N. La primera proteína P_{II} caracterizada en profundidad fue la de *E. coli*, codificada por el gen *glnB* y forma parte del sistema responsable de controlar la actividad del complejo enzimático glutamina sintetasa (Lee y col., 2000).

Luego se identificaron secuencias de genes similares a la proteína P_{II} de *E. coli* en los genomas de cianobacterias así como en varias plantas y algas rojas. En las plantas, estas proteínas contienen secuencias amino terminales adicionales que presumiblemente permitan su localización en el cloroplasto (Forchhammer, 2004).

La proteína P_{II} es trimérica y tiene el potencial de responder a tres señales metabólicas centrales: al estatus energético mediante la concentración intracelular de ATP, al nivel de carbono mediante la detección de la concentración de 2-OG y al nivel de nitrógeno a través de la concentración de glutamina (Forchhammer, 2004).

En *Synechococcus elongatus* se ha estudiado exhaustivamente una proteína perteneciente a la familia de las proteínas de señalización del tipo P_{II}, codificada por el gen *glnB*. Esta proteína trimérica puede encontrarse en cuatro formas distintas, una no modificada y otras tres con distinto número de residuos aminoacídicos fosforilados. La fosforilación máxima se alcanza cuando las células son incubadas en condiciones de limitación de N. Las diferentes formas de la proteína GlnB en este organismo varían en respuesta a los niveles de N intracelular. El mecanismo de detección de N involucraría la maquinaria de asimilación del mismo mediante la vía GS-GOGAT. En caso de inhibición de cualquiera de estas dos enzimas se incrementa el nivel de fosforilación de P_{II}.

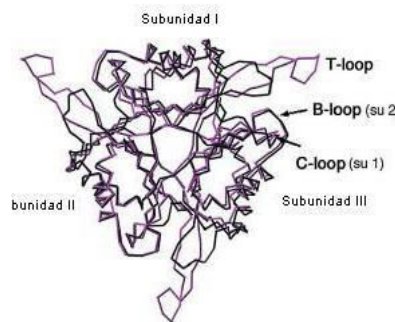


Figura 13. Diagrama de las estructuras superpuestas de las proteínas P_{II} de *E. coli* (negro) y *S. elongatus* (magenta). Vista superior de las estructuras donde se muestran los tres ejes de simetría de las proteínas triméricas. Adaptado de : Forchhammer, 2003

Las proteínas P_{II} de cianobacterias monitorean el estatus de N en la célula mediante la concentración interna de 2-oxoglutarato (2-OG). Las actividades quinasa o fosfatasa de la proteína P_{II} dependen de su estado conformacional, el cual es determinado por la unión cooperativa de ATP y 2-OG. Un incremento de la concentración de 2-OG favorece la fosforilación de P_{II} y la situación contraria se observa en presencia de bajas concentraciones de 2-OG. La proteína P_{II} fosforilada también señalaría la deficiencia de N a la proteína NtcA –factor de transcripción que controla el metabolismo de N-, en ausencia de N combinado en el medio (Forchhammer, 2004).

El mecanismo molecular de acción de esta proteína aún no se conoce con detalle, pero se presume que P_{II} interactuaría directamente con NtcA, o en su defecto con NtcA a través de otro factor desconocido hasta el momento (Forchhammer, 2004).

A pesar de la similitud estructural y de ligandos que existe entre las proteínas de *E. coli* y *Synechococcus* sp. PCC 7942, el modo de transducción de señales es distinto. La proteína P_{II} de proteobacterias se encuentra uridilada en el residuo tirosilo (Y51), localizado en la punta de un *loop* expuesto al solvente (*loop* T). La proteína homóloga de cianobacterias se encuentra fosforilada en un residuo serilo (S49), localizado dos aminoácidos antes del residuo tirosilo conservado. Además, en *E. coli* la señal de N más importante es la glutamina, mientras que en cianobacterias esta señal sería el *pool* intracelular de 2-OG por lo que la fosforilación de esta proteína estaría controlada por dicho metabolito (Lee y col., 2000).

Esto contrasta con el mecanismo observado en las proteobacterias, en las cuales el estatus de nitrógeno (N) es monitoreado mediante la actividad de una enzima modificadora de P_{II}, dependiente de glutamina. El empleo de 2-OG como molécula señal para sensor los niveles de N en las cianobacterias (en lugar de glutamina) permite a la célula *tamponear* el *pool* de glutamina intracelular, el cual puede ser repuesto mediante un recambio (*turnover*) proteico, sin interferir el control de nitrógeno (Forchhammer, 2004).

Capítulo 3

El heterocisto

Como ya ha sido mencionado, las funciones del heterocisto son las de proporcionar un ambiente microaeróbico para el óptimo funcionamiento del complejo nitrogenasa y abastecer con N combinado a las células vegetativas del filamento (Adams y Duggan, 1999). Los heterocistos se desarrollan a distancias regulares -aproximadamente 1 cada 10 células vegetativas- o en los extremos del filamento habiéndose generado modelos que explican este patrón unidimensional de desarrollo (Golden y Yoon, 2003; Adams y Duggan, 1999).

Una vez que el programa de diferenciación se inicia se producen cambios importantes en la fisiología y bioquímica de la célula vegetativa. Se sintetizan al menos dos capas nuevas en la pared. Esto disminuye la difusión de los gases, de modo que todo el oxígeno intracelular se utiliza en la respiración y la cantidad de N₂ que puede difundir es suficiente para saturar al complejo nitrogenasa (van den Hoek y col., 1995).

Otro gran cambio involucra el desensamblaje de algunos componentes del fotosistema II. Esto causa la pérdida de la producción de O₂ y el reciclaje de los aminoácidos contenidos en las ficobiliproteínas. Debido a que las ficobiliproteínas pueden representar aproximadamente un 50% de todas las proteínas solubles en la célula, los heterocistos nuevos no presentan la fluorescencia característica asociada a dichos pigmentos (Zhang y col. 2006). Por otra parte, el fotosistema I

persiste y durante los períodos de luz genera ATP y el poder reductor necesario para la reducción de N₂ (Meeks y Elhai, 2002).

3.1 Estructura del heterocisto

3.1.1 Protoplasma

Los heterocistos tienen una citomorfología reconocible al microscopio óptico. En general son células más grandes que las vegetativas y su protoplasma hialino se caracteriza por la ausencia de gránulos de reserva o vacuolas. La pared celular es más gruesa en comparación con las células vegetativas y esta característica es aún más pronunciada en ambos extremos celulares, donde se proyecta *el nódulo polar*. Los heterocistos terminales poseen solo un nódulo polar (van den Hoek y col., 1995).

3.1.2 Pared celular

El espesor de la pared aumenta debido a la formación de tres capas nuevas que se acumulan sobre la envoltura celular normal (Fig. 14). La capa más interna se denomina *laminada* y se compone principalmente por glicolípidos. La siguiente es la capa denominada *homogénea*, formada por polisacáridos y por último se encuentra la capa más externa denominada *fibrosa*, la cual probablemente se encuentra compuesta por las mismas cadenas de polisacáridos que las de la capa homogénea, pero organizadas de forma menos compacta (Adams y Duggan, 1999). La capa de glicolípidos (*laminada*) es la responsable de reducir la difusión del oxígeno hacia el heterocisto y la capa de polisacárido (*homogénea* y *fibrosa*) posee la función de proteger la frágil capa de glicolípidos (Zhang y col., 2005).

La síntesis de la capa fibrosa es uno de los cambios fisiológicos más tempranos que se pueden visualizar en el microscopio electrónico, luego puede observarse la formación de la capa homogénea y finalmente la fibrosa. Estas capas o envolturas adicionales -particularmente la capa de glicolípidos- reduce la

difusión de gases hacia el heterocisto, manteniendo el ambiente microaeróbico de la célula (Adams y Duggan, 1999).

La importancia de las capas adicionales en los heterocistos se ha demostrado en aquellos mutantes de *Anabaena* PCC 7120, incapaces de efectuar la FBN en condiciones aeróbicas pero capaces de realizar dicho proceso en condiciones de anaerobiosis (Ernst y col., 1992; Adams y Duggan, 1999). Estos mutantes se obtuvieron por inserción del transposón Tn5 en el genoma y se denominaron en su conjunto como mutantes Fox⁻. Los genes *fox* se definen como aquellos que participan específicamente en el proceso de fijación de N en condiciones aerobias (Huang y col., 2005).

Los mutantes Fox presentan fallas en la envoltura del heterocisto convirtiéndola en una barrera inefectiva del oxígeno. La identificación de los mutantes Fox⁻ permitió la identificación de varios genes que participan en la biosíntesis y organización de las capas de polisacárido y glicolípido del heterocisto (Adams y Duggan, 1999; Huang y col., 2005).

La síntesis y estabilización de la capa homogénea de polisacárido requiere de la expresión de tres genes *hetA*, *hetB* (posteriormente denominados *hepA* y *hepB* respectivamente) (Ernst y col., 1992) y *hepC*. HepA posee similitud con las proteínas de transporte de unión al ATP (Khudyakov y Wolk, 1997). Su

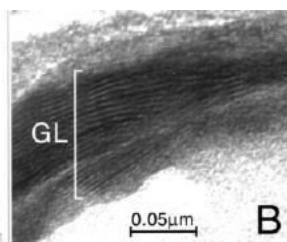
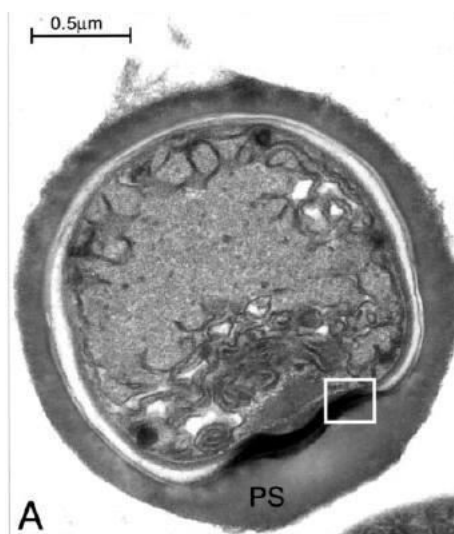
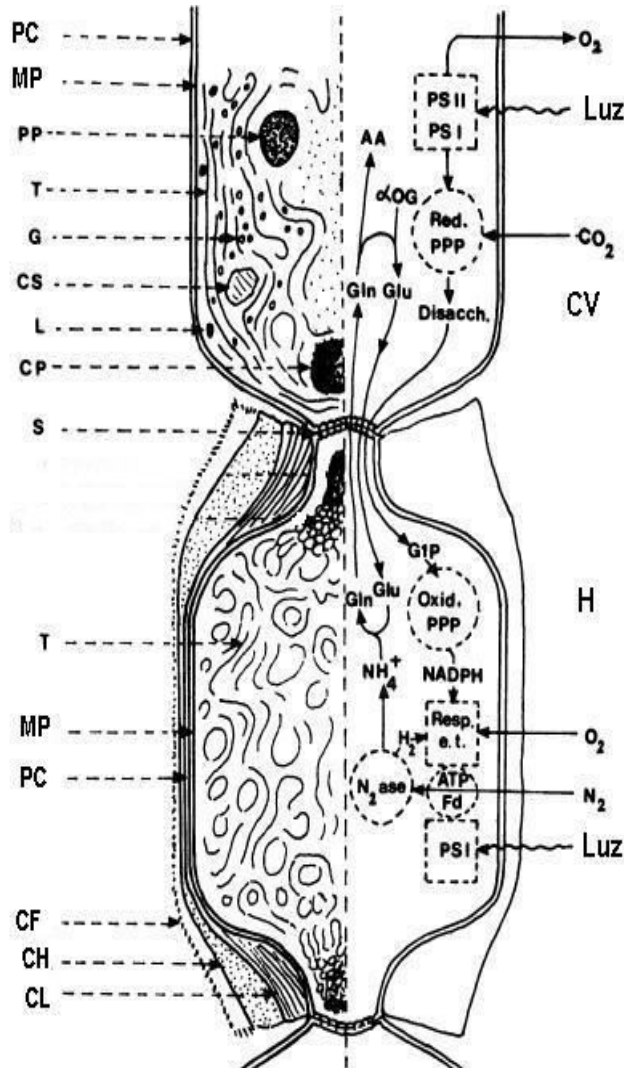


Figura 14. **A)** Heterocisto de *Anabaena* sp. donde se observa la capa de polisacárido que envuelve **(B)** la capa laminar de glicolípidos. PS, capa de polisacárido, GL; capa de glicolípido. Adaptado de Zhou, 2003

transcripción depende de *hetR* (gen esencial para el desarrollo del heterocisto) y se inicia unas 5 a 7 horas luego de la eliminación del nitrato del medio de cultivo y unas horas antes que los cambios morfológicos asociados con la formación del heterocisto se hagan

evidentes mediante microscopía (Wolk, 1973; Holland y Wolk, 1990).

A medida que el proceso de diferenciación avanza, el septo que lo separa de las células vegetativas adyacentes disminuye su diámetro considerablemente hasta convertirse en un poro estrecho, denominado *nódulo polar*. El número de conexiones plasmáticas (*microplasmodesmata*) que atraviesan el septo también disminuye de 3 a 5 veces, alcanzando diámetros de aproximadamente 8nm (Fay, 1992).



3.2 Metabolismo del heterocisto

El proceso de fijación de nitrógeno al igual que el de respiración requiere de poder reductor.

Figura 15. Diagrama que ilustra las características estructurales y las actividades metabólicas de un heterocisto (H) en relación a las células vegetativas (CV) adyacentes. Abreviaciones: PC; Pared Celular, MP; Membrana plasmática, PP; Cuerpos de Polifosfato, T; Tilacoide, G; Gránulo de Glucógeno, CS; Carboxisoma, L; gota lipídica, CP; Gránulo de cianoficina, S; septo con microplasmodesmos, CF, CH y CL; Capas Fibrosa, Homogénea y Laminada, respectivamente, AA; aminoácidos, Glu; Glutamato, Gln; Glutamina, Red. PPP; Vía reductora de las Pentosas Fosfato, Ox. PPP; Vía oxidativa de las Pentosas Fosfato, G1P; Glucosa 1-fosfato, Fd; Ferredoxina, Resp. e.t.; cadena respiratoria de transporte de electrones

Este poder reductor es generado en las cianobacterias a

través del proceso de fotosíntesis (Wolk, 1996).

Como fue descrito anteriormente, la reducción de una molécula de N_2 a amonio mediante el complejo nitrogenasa, requiere de al menos 8 electrones y 16 moléculas de ATP (ver pág. 22). El ATP necesario para el proceso de fijación de N_2 en el heterocisto sería generado durante los períodos de luz por el fotosistema

I mediante fotofosforilación cíclica o por fotofosforilación oxidativa en los períodos de oscuridad (Summers y col., 1995).

Estas células poseen entonces los componentes del fotosistema I para generar ATP pero carecen del fotosistema II que produce O_2 . (Wolk, 1996). Debido a esto han perdido la capacidad de fijar CO_2 fotosintéticamente, por lo que la actividad de fijación de N en estas células depende del abastecimiento de compuestos de carbono reducidos por las células vegetativas adyacentes. Estas moléculas sirven como fuentes de poder reductor y como sustrato para la incorporación del amonio derivado de la reducción de N_2 . Se considera que la sacarosa sería la *molécula vehículo* del carbono reducido (Herrero y col., 2004).

Los estudios de las actividades enzimáticas y los sustratos capaces de sustentar la actividad nitrogenasa en extractos de heterocistos permitieron establecer la participación de las enzimas iniciales de la vía de las pentosas fosfato o de la vía glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) como las fuentes de poder reductor para la conversión de N_2 a amonio y el consumo del O_2 para la respiración (Fig. 15), (Summers y col., 1995).

Aproximadamente, la mitad del poder reductor generado por la fotosíntesis en un filamento se emplea para abastecer los requerimientos del proceso de diferenciación, respiración y fijación de nitrógeno en los heterocistos del mismo (Wolk, 1996). Así, el poder reductor utilizado por los heterocistos, es generado en las células vegetativas vecinas. Además, la tasa respiratoria en estas células es más elevada que en las células vegetativas para poder mantener bajas presiones de O_2 (Wolk, 1996).

Como contrapartida, los heterocistos abastecen a las células vecinas (vegetativas) con aminoácidos sintetizados durante el proceso de la fijación de nitrógeno (Golden y Yoon, 2003). La glutamina sería el principal metabolito involucrado en la exportación del N fijado desde el heterocisto y a pesar de que el mecanismo de transferencia aún no se conoce en detalle, se han propuesto dos mecanismos de transporte entre el heterocisto y las células vegetativas. En uno de estos mecanismos se propone que los aminoácidos serían exportados hacia el

espacio periplásmico -que es continuo a lo largo del filamento- y una vez allí serían incorporados por las células vegetativas a través de permeasas específicas (Herrero y col., 2004). El otro mecanismo propone que las conexiones o poros que comunican células adyacentes (*microplasmodesmata*), representarían la ruta de transporte de metabolitos entre células contiguas (Wolk, 1996).

Según este último mecanismo, los gases y especialmente el O₂, se verían imposibilitados de difundir hacia el interior del heterocisto debido a que la permeabilidad del poro para su difusión sería menor que la de la pared (Fay, 1992). Además, estas conexiones estarían formadas por membranas conteniendo oxidasas que reducirían el nivel interno de oxígeno. Lamentablemente aún no se dispone de resultados experimentales que apoyen esta hipótesis (Wolk, 1996).

También existe una distribución funcional de algunas enzimas para la fijación de N entre las células vegetativas y los heterocistos. Por ejemplo, la glutamina sintetasa (GS) se encuentra presente en ambos tipos de células, pero el complejo GOGAT es casi indetectable en los heterocistos. La enzima isocitrato deshidrogenasa también se expresaría en ambos tipos celulares pero sólo se encontraría activa en los heterocistos (Meeks y Elhai, 2002).

3.3 Protección del complejo nitrogenasa del O₂

Al igual que las nitrogenasas de otras bacterias estudiadas, las nitrogenasas de las cianobacterias son inactivadas de forma irreversible en presencia de O₂. Debido a esto, los organismos fijadores de nitrógeno han desarrollado distintos mecanismos para evitar la inactivación del complejo enzimático (Fay, 1992; Soto-Urzúa y Baca, 2001).

Dentro de dichos mecanismos se ha observado la disminución de la difusión del O₂ mediante la secreción de mucopolisacáridos (*slime*) en la pared celular y la disminución de la pO₂ intracelular a través del aumento de la tasa respiratoria. También existen otras estrategias como la inactivación del complejo enzimático por cambios conformacionales cuando la pO₂ intracelular es alta, o el

consumo de O_2 intracelular mediante la actividad hidrogenasa del complejo nitrogenasa (Fay, 1992).

Asimismo, las especies reactivas del oxígeno como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), producidas en la respiración y la fotosíntesis oxigénica, son eliminadas por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa (Fay, 1992).

3.4 Diferenciación del heterocisto

La cianobacteria filamentosa *Anabaena* PCC 7120 - antes conocida como *Nostoc* PCC 7120- se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de la diferenciación de los heterocistos así como de los patrones de diferenciación celular y la fijación de nitrógeno de las cianobacterias en general (Kaneko y col., 2001).

Se han desarrollado protocolos de manipulación genética y métodos de conjugación de alta eficiencia para este organismo y actualmente se cuenta con la secuencia completa de su genoma. Esta fue obtenida empleando la técnica de *shotgun* y consta de 7.211789 pb distribuidas en un cromosoma de 6.413 771 pb y seis plásmidos denominados como pCC7120 α , β , γ , δ , ϵ y ζ . Mediante cálculos computacionales se han identificado 6228 genes potenciales (que eventualmente deberían codificar para proteínas), de los cuales 5368 se encontrarían en el cromosoma (Kaneko y col., 2001).

3.4.1 Señales necesarias para la inducción de la diferenciación

¿Qué induce a una célula determinada a desviarse del ciclo celular normal y diferenciarse? El programa de desarrollo de los heterocistos se *enciende* en respuesta a la señal externa de agotamiento o falta de una fuente de nitrógeno combinado en el medio (Golden y Yoon, 2003), mientras que es inhibido fuertemente en presencia de amonio.

Otro requerimiento para formación del heterocisto sería la multicelularidad, esto se determinó en experimentos donde se realizaron ablaciones celulares, evitándose así el desarrollo de heterocistos en el filamento (Cai y Wolk, 1997).

3.4.2 Estadios de desarrollo

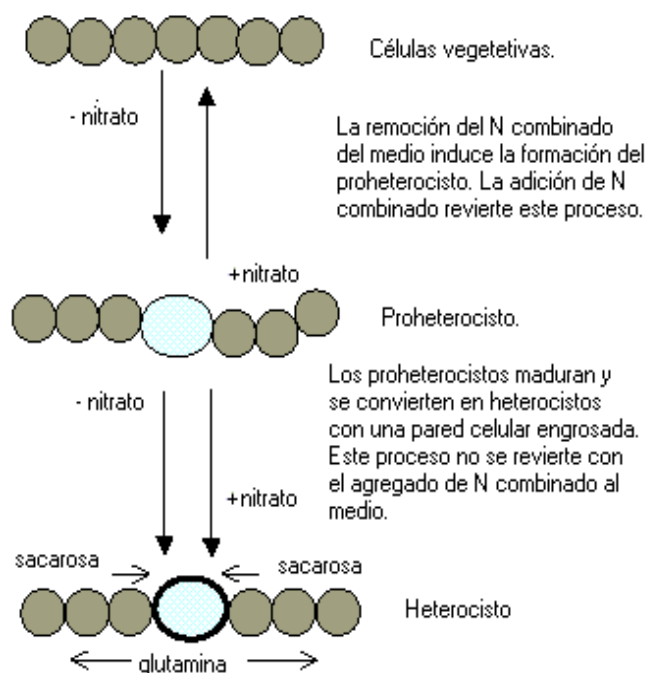


Figura 16. Eventos morfológicos característicos durante la formación del heterocisto. Adaptado de *El-Shehawy y Kleiner., 2003*

El primer estadio en el proceso de diferenciación dura aproximadamente 10 horas (dependiendo de la cepa y las condiciones) y culmina con la formación del *proheterocisto* (Fig. 16) (El-Shehawy y Kleiner, 2003).

Estos pueden distinguirse mediante el microscopio óptico como células menos granuladas que las vegetativas, pero aún sin la presencia de la pared celular engrosada (El-Shehawy y Kleiner, 2003)

Es durante este estadio que comienza la degradación específica de algunas proteínas. Esto conlleva la pérdida de varias funciones, como la actividad del fotosistema II, así como la supresión y destrucción de partes de la maquinaria de fijación de CO₂ (El-Shehawy y Kleiner, 2003). A pesar de que la formación del proheterocisto involucra cambios celulares profundos, es un proceso reversible: luego de agregar nitrógeno combinado (nitrato u amonio) al medio, el proheterocisto revierte hacia la forma de célula vegetativa (El-Shehawy y Kleiner, 2003).

El segundo estadio consiste en la transformación del proheterocisto en un *heterocisto maduro* (Fig. 16). La pared celular se engrosa, en ésta se sintetizan y acumulan glicolípidos y polisacáridos específicos que reducen la difusión del O₂ y

se produce además el rearrreglo genómico que lleva a la expresión funcional de la nitrogenasa y otras enzimas (El-Shehawry y Kleiner, 2003). Se ha sugerido que el establecimiento de una barrera de difusión para el O₂ en el heterocisto podría constituir un *punto de control (checkpoint)* durante el desarrollo y que una vez superado éste se dispararía el proceso de maduración (Herrero y col., 2004).

3.4.3 Eventos moleculares involucrados en el programa de diferenciación

Durante un período de deficiencia de N en el medio, las reservas celulares de este elemento se agotan rápidamente elevando el cociente carbono / nitrógeno (C/N) desde el valor usual de 4,1 hasta 8,1. Sin embargo, la diferenciación del heterocisto se inicia aparentemente cuando dicho cociente supera el valor de 6,1 (Fay, 1992).

La deficiencia de N combinado incrementa rápidamente el nivel de 2-OG intracelular hasta una concentración límite. Esta molécula se une y activa la proteína NtcA que actúa como factor de control de la transcripción. Luego, el efecto de señalización del 2-OG puede ser amplificado a través del proceso de autorregulación positivo de NtcA (Li y col., 2003).

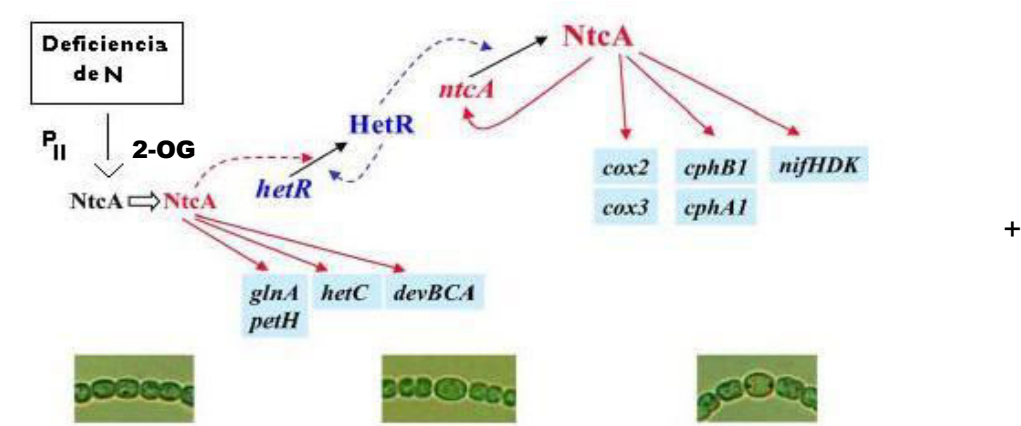


Figura 17. Modelo hipotético de la activación secuencial en la expresión de genes durante el desarrollo de un heterocisto. Las flechas negras representan la expresión del gen desde la transcripción hasta la proteína madura correspondiente. Las flechas rojas continúan la activación transcripcional de distintos genes promovida directamente por la proteína NtcA. Las flechas discontinuas indican la acción positiva que ejerce NtcA (rojo) y HetR (azul) en la expresión de dichos genes. La progresión temporal de los cambios morfológicos (célula vegetativa, proheterocisto, heterocisto maduro) es aproximada. *Adaptado de Herrero A. et al, 2004.*

Como resultado de este *loop* regulatorio, los niveles de transcripción del gen *ntcA* alcanzan el nivel máximo, permitiendo que esta proteína actúe sobre sus promotores blanco (Fig.17) (Li y col., 2003).

NtcA es una proteína reguladora que se une a secuencias de ADN específicas corriente arriba de muchos promotores regulados por N y generalmente potencia su transcripción. Dentro de los genes que induce NtcA se encuentra el de la proteína HetR, aunque probablemente esta inducción se efectúe mediante una proteína tipo histona denominada HanA (El-Shehawy y Kleiner, 2003).

hetR es considerado como un *gen maestro* en el desarrollo del heterocisto y el producto de su expresión, la proteína HetR, es la señal positiva que activa de manera aún desconocida a una gran cantidad de genes. Existe además un regulador negativo, PatS, el cual difunde desde el heterocisto en desarrollo y previene que las células vecinas se diferencien. Utilizando fusiones con el gen que codifica para la GFP (*green fluorescent protein*) y monitoreando la diferenciación celular *in vivo*, Zhang y colaboradores (Li y col., 2003) demostraron que las células más viejas son más propensas a diferenciarse cuando se retira el N del medio (Armitage y col., 2005).

Además, el hecho de que el mutante *hetR* de *Anabaena* sp. PCC7120, incapaz de desarrollar heterocistos también incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} en condiciones de privación de N, sugiere que éste sería un evento previo a la inducción de la expresión de *hetR* (Torrecilla y col., 2004).

Las cianobacterias formadoras de heterocistos poseen diferencias fundamentales en la organización de los genes *nif* con respecto a aquellas que son incapaces de desarrollar este tipo de células (Kallas y col., 1985). En el caso de *Anabaena* PCC7120, se produce el rearrreglo de tres genes: *nifD* que codifica para la subunidad α de la nitrogenasa, *fdxN* que codifica para una ferredoxina bacteriana y *hupL* que codifica para la subunidad mayor de una hidrogenasa (Adams y Duggan, 1999; Meeks y Elhai, 2002).

Al igual que en otros procesos de diferenciación celular, los rearrreglos genómicos determinan de forma irreversible el ordenamiento de genes que tendrá finalmente la célula diferenciada. Una vez culminado este proceso, el filamento consta de dos tipos de células distintos e interdependientes.

3.5 Genes expresados durante la diferenciación

Si bien los genes más relevantes durante la diferenciación del heterocisto son *hetR*, *ntcA* y *patS*, también se han estudiado otros genes que participan en este proceso. Como la información que se dispone acerca de la implicancia y relevancia de dichos genes durante el desarrollo es parcial, considero que el mejor criterio para ordenarlos será el alfabético.

hanA

El gen *hanA* codifica para una proteína con similitud a la histona HU y también es necesario para que se inicie la diferenciación. Los genes *ntcA* y *hanA* no se expresan exclusivamente en los heterocistos y por esta razón se presume que no son responsables directos de la formación del patrón de diferenciación de heterocistos en el filamento (Khudyakov y Golden, 2004).

hepA

El producto de este gen es una proteína del sistema de transporte del tipo ABC, esencial para la síntesis de polisacáridos de la envoltura. Este gen es controlado por HepK (una presuntiva tirosín quinasa), HepC (una proteína con similitud a una galactosil PP-undecaprenol sintasa) y dos proteínas de unión al ADN poco frecuentes (Zhou y Wolk, 2000).

hepK

En *Anabaena PCC7120* la proteína HepK tiene similitud con las histidín quinatas de algunos sistemas sensor-regulador de dos componentes. Junto con la proteína DevR, formarían dicho sistema regulador y participarían en la señalización que dispara la síntesis de polisacáridos de la envoltura del heterocisto (Zhou y Wolk, 2000).

hetR

HetR es un regulador clave en el desarrollo del heterocisto, mutantes *hetR* en *Anabaena* PCC7120 son incapaces de producir heterocistos, mientras que la sobre-expresión del gen en *trans* -empleando un plásmido con copias extra de *hetR*- provoca el fenotipo de heterocistos contiguos múltiples (Mch) (Golden y Yoon, 2003).

La inducción de *hetR* comienza luego de la remoción del N en el medio y al cabo de 2 a 3,5 horas su transcripción aumenta considerablemente en ciertas células que son en realidad heterocistos en desarrollo (Adams y Duggan, 1999). Esta proteína es una serín proteasa inusual ya que requeriría del ion Ca^{2+} *in vivo*, es modificada pos-traduccionalmente, se escinde a sí misma y cuando forma un homodímero presenta motivos de unión al ADN (Huang y col., 2004; Zhang y col., 2006).

La proteína HetR sería modificada por fosforilación y esto a su vez sería la señal para evitar su autodegradación (El-Shehawey y Kleiner , 2003). Dos residuos serina, Ser-152 y Ser-179, son necesarios para la autoproteólisis y la diferenciación, siendo la Ser 152 el residuo del sitio activo de esta proteasa (Dong y col., 2000).

Recientemente se demostró que los homodímeros de HetR se unen a fragmentos de ADN conteniendo regiones de los promotores de *hetR*, *patS* y *hepA* (Khudyakov y Golden, 2004). La actividad de HetR es inhibida por el pentapéptido RGSGR, presente en el extremo C terminal de PatS. Este pentapéptido inhibe la unión de HetR al ADN y previene la autorregulación positiva de este gen (Huang y col., 2004). Aunque su rol bioquímico durante el desarrollo aún es desconocido, HetR posiblemente actuaría degradando represores de genes que deben ser *encendidos* y activadores de genes que deben ser *apagados* (Adams y Duggan, 1999).

Ambos genes *ntcA* y *hetR* son autorregulados positivamente y el *loop* regulador que conforman es central en el desarrollo de los heterocistos. Si bien NtcA es responsable de la regulación de otras actividades celulares aparte del

desarrollo del heterocisto, no sucede lo mismo con HetR. La expresión de HetR es necesaria y quizás suficiente para la formación del heterocisto. Además de *ntcA* se requieren otros genes como *hetF* y *patA* para aumentar la transcripción de *hetR* (Zhang y col., 2006).

hetF

El gen *hetF* de *N. punctiforme* se requiere para la expresión localizada de HetR y para disparar el inicio del desarrollo del heterocisto en la célula vegetativa. Este gen ha sido identificado sólo en cianobacterias formadoras de heterocistos, por lo que se ha propuesto que la proteína HetF restringiría de algún modo la expresión y la acumulación de *hetR* en los heterocistos en diferenciación (Golden y Yoon, 2003). La proteína HetF aparentemente integra una familia única de proteasas con dominios caspasa-hemoglobinas (*caspase-hemoglobinase fold-domain protease*) (Khudyakov y Wolk, 2004).

hetC y *hetL*

Se han identificado otros genes como *hetC*, que se expresa en pro-heterocistos y heterocistos y codifica para una proteína similar a los exportadores bacterianos del tipo ABC. La sobre-expresión del gen *hetL* estimula la formación de heterocistos y se demostró que esta proteína interviene en etapas tempranas del desarrollo del mismo (Golden y Yoon, 2003).

hetN

El producto del gen *hetN* exhibe un porcentaje alto de similitud con las ceto-acil reductasas. Cuando *Anabaena* PCC 7120 es cultivada en presencia de N combinado en el medio, la proteína HetN se encuentra presente en todas las células vegetativas de filamento, mientras que luego de la remoción de éste, la proteína sólo puede detectarse en los heterocistos maduros (Khudyakov y Golden, 2004).

ntcA

NtcA es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los receptores de AMP cíclico (AMPC), muy conservado entre las cianobacterias. En *Anabaena* PCC7120, *ntcA* es necesario en los estadios tempranos del desarrollo

y también para la completa activación de los genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno, así como en la regulación de varios otros genes. Por ejemplo, NtcA se une al promotor de un operón (*devBCA*) que codifica para un transportador del tipo ABC esencial para la maduración del heterocisto, siendo necesario para su transcripción (Golden y Yoon, 2003). También existen evidencias de que esta proteína sería el principal sensor de los niveles de 2-OG durante la iniciación del heterocisto.

patA

La secuencia proteica de PatA indica que actúa como regulador de respuesta a los cambios en el medio y que forma parte de un sistema de dos componentes. PatA contiene un residuo Asp conservado el cual podría ser fosforilado por una histidin quinasa, aunque no se ha identificado un gen que codifique para un posible sensor quinasa en las cercanías del mismo. Los reguladores de respuesta de la clase de PatA poseen una de tres funciones: pueden fosforilar otras proteínas, pueden unirse al ADN y activar la transcripción de los genes cuyo promotor fue reconocido o pueden causar la rotación de un motor flagelar (Buikema y Haselkorn, 2000).

Se ha demostrado que el producto del gen *patA* afecta la actividad de HetR a nivel post transcripcional, probablemente por interacciones proteína-proteína. PatA podría interactuar directamente con HetR previniendo la autoproteólisis o promoviendo la inhibición de unión al ADN mediada por PatS (Zhang y col., 2006).

patB

La proteína PatB presenta dominios con homología a la ferredoxina (*ferredoxin-like domains*) en su extremo amino terminal y un dominio de unión al ADN en su extremo carboxi terminal. Esto sugiere que dicha proteína podría actuar como factor de transcripción y que además su actividad estaría modulada por el estado redox de la célula. La expresión de *patB* se induce 12 horas después de la remoción del N combinado en el medio y está confinada a los heterocistos. Por otra parte, las mutaciones en *patB* resultan en la diferenciación retardada de los heterocistos y poco o nada de crecimiento diazotrofo (Khudyakov y Golden, 2004).

patS

patS codifica para un pequeño péptido que controla el patrón de desarrollo de los heterocistos a lo largo del filamento. La señal difusible PatS es producida por las células en diferenciación e inhibe este proceso en las células vecinas. El receptor de PatS se localizaría en el citoplasma de las células vegetativas, lo cual es consistente con la inhibición directa que ejerce sobre la función de HetR. (Wu y col., 2004).

Cuando se anula este gen del organismo y se retira el N del medio, resulta un patrón aberrante con fenotipo Mch (Khudyakov y Golden, 2004). El inhibidor PatS y el activador HetR podrían satisfacer los requerimientos primarios del modelo de regulación del patrón de desarrollo por inhibición lateral (Wu y col., 2004). Los genes *patS* y *hetN* poseen funciones distintas pero complementarias en la determinación y mantenimiento del patrón de desarrollo de los heterocistos en el filamento (Khudyakov y Golden, 2004).

Otros genes *pat*

Otros dos genes, *patN* y *patU* han sido recientemente descritos en la formación del patrón unidimensional de desarrollo en *N. punctiforme*. Se encontraron genes ortólogos en *Anabaena* PCC7120, pero las proteínas no muestran similitud con otras descritas hasta el momento (Khudyakov y Golden, 2004).

Capítulo 4

Metabolismo del N en cianobacterias

Las cianobacterias participan activamente en el ciclo biogeoquímico del N, incorporándolo a la biosfera. Son capaces de asimilar este elemento del ambiente en distintas formas químicas, por ejemplo, cuando se encuentra formando compuestos inorgánicos como nitrato y amonio o en moléculas orgánicas pequeñas como urea o aminoácidos o aún en su forma biatómica.

4.1 Rutas de asimilación de N

Debido a que la concentración de compuestos que contienen N es generalmente muy baja en el ambiente (menos de 1 μ M), la incorporación de los mismos a las células se efectúa mediante transportadores activos de alta afinidad localizados en la membrana citoplasmática (Flores y Herrero, 2005).

Como ocurre con todas las bacterias, la fuente de N preferida por estos organismos es el amonio, aunque también son capaces de asimilar otras moléculas pequeñas como nitrito, nitrato y urea (Fig.18). Asimismo, se han descrito otras cepas capaces de asimilar algunos aminoácidos, particularmente arginina, glutamina, etc. Muchas cianobacterias también son capaces de reducir el N₂ gaseoso, a través del proceso de FBN.

A continuación se describen más detalladamente los genes principales que participan en las vías de incorporación de los distintos compuestos nitrogenados.

4.1.1 Asimilación de nitrato y nitrito

La incorporación de nitrato o nitrito a las células se efectúa mediante una permeasa codificada por los genes *ntrA*, *ntrB*, *ntrC* y *ntrD* en *Synechococcus* PCC7942 y en *Anabaena* PCC7120. Estos genes se agrupan con los genes estructurales de la enzima nitrito reductasa *nirA* y nitrato reductasa *narB*. Juntos constituyen el operón *nir*, de estructura: *nirA-ntrABCD-narB* que es fuertemente expresado sólo cuando hay nitrito o nitrato pero no amonio en el medio (Herrero y col., 2001).

Estas permeasas del tipo ABC (tipo primario) utilizan ATP para incorporar sus sustratos y así concentrarlos en el interior de la célula. Se han reportado transportadores del tipo ABC (*ATP binding cassette*) para la asimilación de nitrato/nitrito, urea y en el transporte de arginina y glutamina en distintas cianobacterias. Sin embargo, en algunas cepas también se ha descrito la incorporación de nitrato/nitrito a través de permeasas del tipo secundarias (Flores y Herrero, 2005).

En cianobacterias marinas como *Synechococcus* PCC7002 y *Trichodesmium* WH9601 la incorporación de nitrito se efectúa a través de un transportador secundario perteneciente a la superfamilia de facilitadores principales, codificado por un gen conocido con dos nombres, a saber *ntrP* o *napA* (Wang y col., 2000). Una vez internalizado el nitrato, el mismo es reducido a amonio en dos reacciones secuenciales catalizadas por las enzimas ferredoxina nitrato reductasa y ferredoxina nitrito reductasa.

El mecanismo de incorporación de nitrato, en general, parece estar regulado por algún sistema que integra los metabolismos de biosíntesis de aminoácidos a través de la fotosíntesis y la asimilación de C. Los transportadores de nitrito/nitrato de varias cianobacterias requieren que las células fijen CO₂ para funcionar correctamente y se encuentran sujetos a una rápida inhibición reversible

por amonio, el cual debe además debe estar siendo metabolizado por la enzima GS para que este efecto inhibitor tenga lugar (Herrero y col., 2001).

4.1.2 Fijación de nitrógeno

Los genes necesarios para la fijación de nitrógeno han sido caracterizados en detalle en dos tipos de organismos formadores de heterocistos: *Anabaena* PCC7120, *Anabaena variabilis* ATCC29413 y en la cianobacteria unicelular *Synechococcus* RF-1 (Herrero y col., 2001).

La nomenclatura de los genes *nif* es la misma que en las otras bacterias, identificándose quince genes directamente responsables o relacionados con la fijación de nitrógeno, incluyendo los estructurales *nifHDK*. Estos se agrupan del modo siguiente: *nifB-fdxN-nifS-nifU-nifH-nifD-nifK-nifE-nifN-nifX-orf2-nifW-hesA-hesB-fdxH*. Además, en este grupo pudieron identificarse al menos seis unidades transcripcionales (Herrero y col., 2001).

Los genes *nif*, junto a otros relacionados con la fijación de nitrógeno no se expresan en presencia de N combinado en el medio. La regulación de estos genes puede ser muy compleja, ya que en algunas cianobacterias parece estar sujeta a los ritmos circadianos (Misra y Tuli, 2000) y en las especies formadoras de heterocistos, la fijación de nitrógeno estaría confinada a éstos.

4.1.3 Asimilación de urea y degradación de cianato

La urea representa una fuente de N importante para las cianobacterias en su ambiente natural. En *Anabaena* PCC7120 se ha caracterizado un transportador activo primario del tipo ABC codificado por cinco genes, con alta afinidad por la urea y reprimible por amonio (Herrero y col., 2001). En general, las cianobacterias poseen ureasas algunas expresadas constitutivamente y otras reprimibles por amonio. También se ha identificado una ureasa cuyos genes estructurales se denominan *ureA*, *ureB*, y *ureC* (Herrero y col., 2001).

Una vez en la célula, la urea es degradada a amonio y anhídrido carbónico mediante una reacción catalizada por una ureasa dependiente del ión Ni^{+2} (Flores y Herrero, 2005).

Del mismo modo, se han detectado niveles altos de la enzima cianasa en dos cepas de *Synechococcus*, además de identificarse el gen *cynS* que codificaría para esta enzima. La cianasa cataliza la descomposición del cianato en anhídrido carbónico y amonio. La actividad de esta enzima, junto con la expresión del gen *cynS* y sus genes relacionados, son reprimidos en presencia de amonio (Herrero y col., 2001).

4.1.4 Incorporación de amonio

Como se mencionó anteriormente, el amonio es la fuente de N preferencial de las cianobacterias. Aunque es sabido que el amoníaco (NH_3) es capaz de atravesar las membranas biológicas, a pH ácido (pH de muchos hábitats como suelos y aguas) este compuesto se encuentra en la forma ionizada como amonio (NH_4^+).

Esta molécula cargada positivamente es incapaz de difundir al interior celular, además debemos tener presente el hecho de que las concentraciones de amonio en el ambiente son muy bajas. Por estas razones, las células necesitan de transportadores para ingresar el amonio, especialmente cuando su concentración en el ambiente es inferior a $1\mu\text{M}$.

Se han identificado transportadores secundarios pertenecientes a la familia Amt (Flores y Herrero, 2005). Estas permeasas han sido identificadas en ensayos bioquímicos de incorporación y acumulación del análogo no metabolizable [^{14}C] metilamonio por la cianobacteria unicelular *Synechocystis* PCC6803 (Montesinos y col., 1998)

Estudios análogos en *Anabaena variabilis* ATCC29413 sugieren que las permeasas Amt de los heterocistos funcionan para la retención cíclica del

amoníaco producido por la nitrogenasa (El-Shehway , 1999) . También les atribuye la función de sensar la concentración de amonio en el medio.

4.1.5 Incorporación de aminoácidos

La cantidad de información existente acerca del transporte de aminoácidos en cianobacterias formadoras de heterocistos es escasa. Se ha sugerido que en *Anabaena* PCC7120 algunas permeasas serían las responsables del pasaje intercelular de metabolitos en el filamento. La caracterización fisiológica de mutantes espontáneos en el transporte de aminoácidos en éste organismo ha permitido determinar que expresa al menos cinco permeasas de aminoácidos distintas. Aparentemente se expresarían dos transportadores activos específicos para

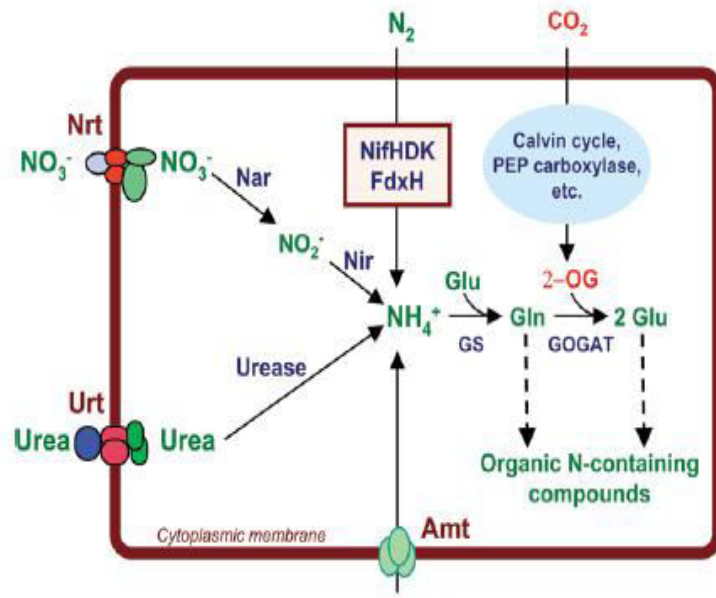


Figura 18. Principales rutas de asimilación de N en las cianobacterias. Las fuentes de N combinado son incorporadas mediante permeasas específicas y metabolizadas a amonio, el cual se incorpora a los esqueletos carbonados a través de la vía GS-GOGAT. El N luego es distribuido en forma de glutamina o glutamato a otros compuestos orgánicos. **Nrt**: transportador de nitrito/nitrato del tipo ABC. **Urt**: transportador de urea del tipo ABC. **Amt**: permeasa de amonio. **Nar**: nitrato reductasa. **Nir**: nitrito reductasa. **NifHDK**: complejo nitrogenasa. **FdxH**: ferredoxina específica de heterocisto. **PEP carboxilasa**: fosfoenolpiruvato carboxilasa. **2-OG**: 2-oxoglutarato. **GS**: glutamina sintetasa. **GOGAT**: glutamato sintasa. Adaptado de: Flores y Herrero, 2005.

aminoácidos neutros, un transportador activo de alta afinidad para aminoácidos básicos, un sistema pasivo de baja afinidad para aminoácidos básicos y un transportador para aminoácidos ácidos (Herrero y Flores, 1990).

La *permeasa N-I* transporta una variedad de aminoácidos neutros polares e hidrofóbicos y se encuentra codificada por los genes *nat*. Esta permeasa representa casi la única vía de asimilación de Pro y sería la vía de asimilación principal de Gly, Phe Leu (y probablemente de Ile y Val) y una vía importante de asimilación de Thr, Ala y Ser en *Anabaena* sp. (Picossi y col., 5). Los genes *nat* serían expresados diferencialmente en las células vegetativas y en los heterocistos. En las células no diferenciadas la expresión de este operón sería constitutiva y en los heterocistos el operón estaría reprimido (Picossi y col., 2004).

Estos resultados son concordantes con el mecanismo propuesto para el transporte de aminoácidos entre el heterocisto y las células vegetativas contiguas. A través del mismo se produciría la transferencia de ciertos aminoácidos desde el heterocisto al espacio periplásmico. Luego estos aminoácidos difundirían (quizás unidos a proteínas transportadoras) hasta ser incorporados por permeasas de células vegetativas adyacentes (Montesinos y col., 1995; Armitage y col., 2004).

Todos los sistemas de transporte descritos anteriormente, junto con la batería de enzimas que acompaña a cada uno, finalmente asegura que cualquier fuente de N incorporada para el crecimiento del organismo sea transformada en amonio intracelular, el cual a su vez es inmediatamente incorporado para la síntesis de aminoácidos por la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT).

4.2 Regulación del metabolismo nitrogenado

La regulación o control de los niveles de N puede describirse como la represión de una vía de asimilación de determinada fuente de nitrógeno, cuando se encuentra disponible otra más fácilmente asimilable para la célula. Por ejemplo, cuando una suspensión de cianobacterias es incubada a una concentración de amonio limitante pero con una fuente de carbono adecuada, estos organismos determinan la relación C/N como alta y comienzan expresar genes para la asimilación de fuentes alternativas de N y para el transporte activo de amonio de modo de reestablecer la relación.

4.2.1 Regulación transcripcional

La activación de la expresión del conjunto de genes que participan en la regulación del nitrógeno requiere un factor transcripcional perteneciente a la familia de los CAP (proteína receptora de AMP cíclico o activador por catabolito) y que en el caso de las cianobacterias, se ha denominado NtcA. Estudios de difracción de rayos X, junto con el estudio de modelado computacional de la proteína a nivel teórico (realizado a partir de la estructura de CAP), confirman la similitud de NtcA con el factor CAP y la presencia de un motivo de unión al ADN hélice α -vuelta-hélice α , en su extremo C terminal (Flores y Herrero, 2005).

El sitio de unión de NtcA al ADN se encuentra 22 nucleótidos corriente arriba de la secuencia ubicada en la posición -10 del promotor, siendo esta estructura muy similar a la de los promotores clase II de bacterias. A pesar de que el mecanismo preciso de la modulación de NtcA aún no es conocido, se han identificado metabolitos tales como el 2-OG y la proteína P_{II} (codificada por el gen *glnB*) capaces de influenciar la actividad de esta proteína (Flores y Herrero, 2005).

Empleando la técnica de geles de retardo se pudo demostrar que el 2-OG incrementa la afinidad de unión de NtcA al promotor de *glnA* (gen estructural de GS) de *Synechococcus* PCC7942. Esto permitió sugerir que el 2-OG actuaría como regulador alostérico positivo del factor transcripcional NtcA (Vázquez-Bermúdez y col., 2002).

El papel que juega la proteína transductora de señales del tipo P_{II} en la regulación del N o en la modulación de NtcA es menos claro. Se ha propuesto que P_{II} no sería estrictamente necesario en la regulación a nivel transcripcional (Arcondéguy y col., 2001; Herrero y col., 2001) pero indirectamente tendría un efecto modulador sobre NtcA a través de su unión al 2-OG (Laurent y col., 2004; Flores y Herrero 2005)

4.2.2 Regulación postraducciona

La mayoría de los genes que codifican para permeasas o enzimas involucradas en la asimilación de compuestos nitrogenados son reprimidos por amonio en las cianobacterias. El control transcripcional es el principal mecanismo de regulación de la asimilación de nitrógeno en estos organismos, aunque también se han descrito algunos casos de regulación postraducciona (Herrero y col., 2001).

Algunos ejemplos de esta inactivación post traducciona son: la inactivación de la nitrogenasa reductasa por palmitilación (en *Gleothece* ATCC27152), la inhibición a corto plazo por amonio, de la incorporación de nitrato o la inactivación reversible de la glutamina sintetasa por unión no covalente de un compuesto fosforilado, probablemente P_{II} (Herrero y col., 2001).

La Fe proteína del complejo nitrogenasa puede ser modificada a una forma inactiva *in vitro* al ser incubada en condiciones de pO₂ altas y oscuridad o en presencia de amonio. Recientemente se ha sugerido este tipo de modificación podría operar a través de la palmitoilación de la proteína en la cianobacteria unicelular *Gleothece* sp. ATCC 27152 (Herrero y col., 2001).

La presencia de amonio en el medio de cultivo también provoca la inactivación de la glutamina sintetasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dicha actividad es recuperada paulatinamente, en respuesta al decremento del amonio en el medio. Experimentos realizados *in vitro* con esta proteína sugieren que la inactivación podría deberse a una modificación de la misma debida a la unión no covalente de algún compuesto fosforilado (Herrero y col., 2001).

Se ha sugerido que la proteína P_{II} sería el compuesto responsable de la inhibición de la asimilación de amonio y nitrito, en *Synechococcus* PCC7942. El mecanismo que explicaría la inhibición propone que existen distintas formas fosforiladas de la proteína P_{II}, siendo este nivel de fosforilacion dependiente de la relacion C/N (Herrero y col., 2001).

De este modo, P_{II} se encontraría completamente defosforilada en presencia de amonio en el medio y se fosforilaría en distintos grados, en presencia de nitrato o en ausencia de cualquier fuente nitrogenada. El grado de fosforilación de la proteína también sería dependiente de la concentración de CO_2 . En resumen, de acuerdo al mecanismo propuesto, P_{II} defosforilada inhibiría el transporte de nitrato (Herrero y col., 2001).

Como en *E. coli*, en *Synechococcus* la proteína P_{II} puede unir como ligandos las moléculas de ATP y 2-oxoglutarato de forma cooperativa. Se presume que en *Synechococcus* estos dos ligandos unidos a P_{II} serían sustrato de una quinasa dependiente de ATP. En cambio, la proteína fosforilada pero sin el ligando 2-oxoglutarato sería sustrato para una fosfatasa (Herrero y col., 2001).

También se ha propuesto otro sistema de inactivación en el cual se produciría la unión a la proteína de uno o dos factores de transcripción (IF7 e IF17), que serían inducidos rápidamente luego de agregar amonio a células de *Synechocystis* (Herrero y col., 2001).

Conclusiones

Las cianobacterias son organismos procariotas muy antiguos que han evolucionado junto a los cambios químicos que sufrieron los océanos y la atmósfera a través de la historia. Se ha propuesto que fueron responsables de oxigenar la atmósfera, (como consecuencia de la fotosíntesis oxigénica que llevan a cabo) en un período comprendido entre 2200 y 2400 millones de años atrás. También se ha propuesto que las cianobacterias habrían sido los organismos precursores de los cloroplastos, en un evento endocítico temprano en la evolución.

Aunque presentan diámetros celulares que van desde 0,5 μm hasta 200 μm , el tamaño celular es, en general, superior al del resto de las bacterias. Esta característica permite observar fácilmente su morfología con un microscopio óptico. El citoplasma suele presentar carboxisomas, vesículas de gas, gránulos de poli β -hidroxibutirato y de cianoficina. Los tilacoides no se encuentran contenidos en cloroplastos, sino que se organizan en un sistema de membranas profusas que se distribuyen en el citoplasma. Los tilacoides contienen el aparato molecular de la fotosíntesis y se forman por invaginación de la membrana plasmática, con la que suelen conservar comunicación.

Poseen un solo tipo de pigmento fotosintético, *clorofila a*, aunque también poseen pigmentos accesorios de la fotosíntesis, denominados ficobilinas o ficobiliproteínas. Las ficocianina, una clase de ficobiliproteína (azul), junto con la clorofila, (verde) dan el color verde azul característico de estos organismos. Las ficobiliproteínas se organizan en un nivel estructural superior denominado ficobilisoma.

La envoltura celular es del tipo Gram-negativa, compuesta por una membrana plasmática y una membrana externa, situándose entre ambas una

pared de mureína (peptidoglucano). Además, en su capa más externa, secretan una serie de exopolisacáridos que pueden dar origen a estructuras tipo vaina o a capas mucilaginosas (más solubles) que envuelven colonias o filamentos móviles o que en su defecto, pueden permanecer como exopolisacáridos secretados al ambiente.

La diversidad morfológica de estos organismos es considerable: se han descrito formas unicelulares cocoides (esferoidales), agregadas en una cápsula mucilaginosa, o formando hileras simples de células contiguas, denominadas tricomas. Se denomina filamento al tricoma rodeado de una vaina o capa mucilaginosa. Los filamentos pueden aparecer agregados en haces, envueltos por mucílago, o de una manera que aparenta ramificación. Existen además cianobacterias que forman filamentos con ramificación verdadera. Este tipo de organización contradice la idea de que los procariontes no se organizan en estructuras pluricelulares.

Este grupo de organismos fue clasificado históricamente como *algas verde azules* (Cyanophyta). Luego del descubrimiento de su naturaleza procariota las cianobacterias se encuentran sujetas a dos sistemas de clasificación: el del Código Botánico del *International Code of Botanical Nomenclature* y por otro lado el Código Bacteriológico del *International Committee on Systematic Bacteriology*.

La sistemática de las cianobacterias es aún tema de discusión entre Botánicos (Cyanophyta, algas verde azules) y Bacteriólogos (Cianobacterias), aunque la tendencia actual es intentar unificar estos criterios para lograr una única clasificación consistente. Actualmente se sugiere que la evaluación taxonómica moderna de este grupo de organismos se debería realizar a través de un abordaje polifásico, empleando métodos de caracterización fenotípica, ultraestructural, ecológica, bioquímica y molecular.

Dada su amplia distribución y su abundancia en distintos ambientes, juegan un papel importante en la circulación de nutrientes, incorporando nitrógeno a la biosfera. Las cianobacterias son en general organismos fotosintéticos, pero algunos son heterótrofos o poseen un metabolismo mixto.

Algunas cianobacterias participan en el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), siendo capaces de reducir el N_2 gaseoso a amonio (NH_4^+), en una reacción catalizada por el complejo nitrogenasa. Durante este singular proceso metabólico, el organismo consume una cantidad importante de energía. El complejo enzimático nitrogenasa, muy conservado a través de la evolución, se encuentra codificado por los genes *nif* y es inhibido en presencia de O_2 . Por este motivo, las cianobacterias han desarrollado distintas estrategias para proteger la nitrogenasa del oxígeno. Algunas separan temporalmente la fijación de N_2 , (esencialmente microaerofílica) de la fotosíntesis (proceso productor de O_2).

Otras forman agregados de células en hileras, denominados tricomas y generan un ambiente microaerobio en el centro de éste, donde se concentra el complejo nitrogenasa y se produce la fijación de N. Esta estrategia también permite que la fotosíntesis que se realice simultáneamente en células que se encuentran en la zona más externa del tricoma.

Algunas cianobacterias filamentosas son capaces de diferenciar un determinado porcentaje de sus células, ubicadas a intervalos regulares, en heterocistos capaces de reducir el N_2 atmosférico. Los heterocistos son células vegetativas completamente diferenciadas (han perdido la capacidad de dividirse) que mantienen un ambiente micro-óxico para el óptimo funcionamiento y protección del complejo nitrogenasa. Luego que el programa de diferenciación se inicia, se producen cambios importantes en la fisiología y bioquímica de la célula vegetativa. Se sintetizan capas nuevas en la pared (capas laminada, homogénea y fibrosa), lo que disminuye la difusión del O_2 al interior celular y se produce el desensamblaje de algunos componentes del fotosistema II, causando la pérdida de la producción de O_2 en la célula. Desde hace un tiempo se ha confirmado además, la presencia de celulosa en la pared celular de algunas especies filamentosas.

El programa de diferenciación celular de los heterocistos se *enciende* en respuesta a la señal externa de agotamiento o falta de una fuente de nitrógeno combinado en el medio, mientras que es inhibido fuertemente en presencia de amonio. La molécula que señala el aumento de la relación C/N (déficit de N) en las células es el 2-oxoglutarato (2-OG). En condiciones de déficit de N aumenta

concentración celular de 2-OG hasta un valor máximo, uniéndose y activando la proteína NtcA. Esta proteína es muy importante en la regulación del metabolismo del N, ya que actúa como factor de transcripción de muchos promotores regulados por N. NtcA induce el gen *hetR*, considerado un *gen maestro* en el desarrollo del heterocisto. La proteína HetR es la señal positiva que activa de manera aún desconocida varios genes involucrados en el proceso de diferenciación de las células vegetativas a heterocistos. Existe además un regulador negativo, PatS, el cual difunde desde el heterocisto en desarrollo y previene que las células vecinas se diferencien.

Además, otro requerimiento para formación del heterocisto sería la multicelularidad. Desde el punto de vista morfológico se pueden distinguir dos estadios de desarrollo, el de pro-heterocisto (aún reversible) y el de heterocisto maduro (irreversible).

Una vez diferenciado el heterocisto, el poder reductor necesario para la fijación de nitrógeno es suministrado por las células vegetativas vecinas y como contrapartida, éstas son abastecidas con aminoácidos (glutamina) sintetizados durante el proceso de la fijación de nitrógeno por el heterocisto. Se han propuesto dos mecanismos para el transporte de la glutamina desde el heterocisto hacia las células vegetativas: en uno el transporte se daría a través de los microplasmodesmos ubicados entre el heterocisto y las células vegetativas adyacentes y en el otro se propone la extrusión del aminoácido desde el heterocisto al espacio periplásmico y la reincorporación del mismo por las células vegetativas continuas, a través de permeasas específicas.

Cuando el N se encuentra presente en forma de compuestos asimilables en el ambiente, las cianobacterias los incorporan a través de transportadores activos de alta afinidad, localizados en la membrana citoplasmática. La fuente de N preferida por estos organismos es el amonio, aunque también son capaces de asimilar otras moléculas pequeñas como nitrito, nitrato y urea. Asimismo, se han descrito otras cepas capaces de asimilar algunos aminoácidos, particularmente arginina y glutamina. En estos organismos, la mayoría de los genes que codifican para permeasas o enzimas involucradas en la asimilación de compuestos nitrogenados son reprimidos por amonio. El control transcripcional es el principal

mecanismo de regulación de la asimilación de nitrógeno en estos organismos, aunque también se han descrito algunos casos de regulación postraducciona.

El estudio de las cianobacterias comprende una gran variedad de temas de interés científico, que abarcan líneas de investigación básicas así como aplicadas. Debido a su antigüedad, estos organismos contienen en su genoma información muy valiosa, que ha sido empleada en el estudio y reconstrucción filogenética de la vida. El conocimiento acerca del programa de diferenciación celular que se ejecuta para formar un heterocisto ha avanzado significativamente en los últimos años, pero aún no se han podido responder preguntas como la relación existente entre el ciclo celular de las células vegetativas y el comienzo del desarrollo del heterocisto. También quedan planteadas interrogantes acerca de la naturaleza de las señales que operan entre las células de un filamento y los mecanismos de transducción de señal que sensan y responden a esas señales.

Por otra parte, debido a su amplia distribución y a su diversidad metabólica, integran una variedad de comunidades microbianas en las cuales cumplen principalmente la función de productores primarios. Esta función además contribuye de forma importante al balance entre CO_2 y O_2 en la atmósfera. Por esto, también han sido objeto de estudios ecológicos. Finalmente, el estudio de las poblaciones presentes en ambientes extremos ofrece la posibilidad de descubrir enzimas o vías metabólicas con interés biotecnológico. Todo esto convierte a las cianobacterias en un objeto de estudio que ofrece una cantidad casi inabarcable de temas de investigación, este grupo singular de organismos aún nos ofrece más interrogantes que respuestas.

Bibliografía

- Adams, D. G. and Duggan, P. S. (1999) Transley Reviews. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**: 3-33.
- Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1985) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1 - Introduction. *Arch Hydrobiol Suppl* **71**: 291-302.
- Aparicio-Tejo, P. M., Arrese-Igor, C., Becana, M., (2000) Cap. 16 Fijación biológica de nitrógeno. pp. 247-50 *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcon-Bieto, J. y Talón, M. (ed.) Interamericana - McGraw-Hill, Madrid, España.
- Arcondéguy, T., Jack, R. and Merrick, M. (2001) PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(1): 80–105.
- Armitage, J. P., Holland, I. B., Jenal, U. and Kenny, B. (2005) Neural Meeting Reviews Networks in Bacteria: Making Connections. *J. Bacteriol.* **187**(1): 26-36.
- Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W. and Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin). Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5561-5570.
- Berman-Frank, I., Lundgren P. and Falkowski, P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* **154**: 157–164
- Böhme, H. (1998) Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Sci. Rev.* **3**(9): 346-351.
- Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001) *En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. New York, USA, Springer-Verlag, pp.721.
- Buikema, W. J. and Haselkorn, R. (2000) Expression of the *Anabaena hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *PNAS* **98**(5): 2729-2734.

- Cai, Y. and Wolk, C.P. (1997) *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 Responds to Nitrogen Deprivation with a Cascade-Like Sequence of Transcriptional Activations. *J. Bacteriol.* **179**(1): 267-271.
- Cooley, J. W., Howitt, C. A. and Vermaas, W. F. J. (2000) Succinate:Quinol Oxidoreductases in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Presence and Function in Metabolism and Electron Transport. *J. Bacteriol.* **182**(3): 714-722.
- Dong, Y., Huang, H., Wu, X. and Zhao, J. (2000) Identification of the Active Site of HetR Protease and Its Requirement for Heterocyst Differentiation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **186**(6): 1575–1579.
- Eckardt, N.A. (2006) In Brief. Energy Dissipation: New Role for a Carotenoid Protein in Cyanobacteria. *Plant Cell.* **18**: 785.
- El-Shehawy, R. M. and Kleiner, D. (1999) Ammonium (methylammonium) transport by heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**: 303-306.
- El-Shehawy, R. M. and Kleiner, D. (2003) The mystique of irreversibility in cyanobacterial heterocyst formation: parallels to differentiation and senescence in eukaryotic cells. *Physiol. Plant.* **149**: 49-55.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y. and Panoff, J. M. (1992) Synthesis of Nitrogenase in Mutants of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 Affected in Heterocyst Development or Metabolism. *J. Bacteriol.* **174**(19): 6025-6032.
- Fani, R., Gallo, R. and Lio, P. (2000) Molecular Evolution of Nitrogen Fixation: The Evolutionary History of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* Genes. *J. Mol. Evol.* **5**: 1-11.
- Fay, P. (1992) Oxygen Relations of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* **56**(2): 340-373.
- Flores, E. and Herrero, A. (2005) Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 164-167.
- Forchhammer, K. (2004) Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 319-333.
- Golden, J. W. and Yoon, H.-S. (2003) Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin Microbiol.* **6**: 557-563.
- Grossman, A. R., Bhaya, D. and He, Q. (2001) Tracking the Light Environment by Cyanobacteria and the Dynamic Nature of Light Harvesting. *J. Biol. Chem.* **276**(15): 11449–11452.

- Halbleib, C., M. and Ludden P. W. (2000) Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J. Nut.* 1081-1084.
- Herrero, A. and Flores, E. (1990). Transport of Basic Amino Acids by the Dinitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **265**(5): 3931-3935.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. and Flores, E. (2001) MINIREV. Nitrogen Control in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **183**(2): 411–425.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Valladares, A. and Flores, E. (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 469-487.
- van den Hoek C., Mann, D. G. and Jahns, H. M. (1995) Ch. 2 Cyanophyta (= Cyanobacteria). pp.16-30 *En: Algae. An introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hoffmann, L., Komárek, J., & Kaštovský, J. (2005) System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) -state 2004. *Algol Stud* **117**:95-115
- Hoiczky, E. and Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* **182**(5): 1191-1199.
- Holland, D. and Wolk, P.C. (1990). Identification and Characterization of hetA, a Gene That Acts Early in the Process of Morphological Differentiation of Heterocysts. *J. Bacteriol.* **172**(6): 3131-3137.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S. (1994) Group 11. Oxigenic Phototrophic Bacteria pp. 337. *En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, USA.
- Howard-Williams, C. and Vincent, W. F. (1989). Microbial communities in southern Victoria Land streams (Antarctica). I. Photosynthesis. *Hydrobiol.* **172**: 27-38
- Huang, G., Fan, Q., Lechno-Yossef, S., Wojciuch, E., Wolk, C. P., Kaneko, T. and Tabata, S. (2005) Clustered Genes Required for the Synthesis of Heterocyst Envelope Polysaccharide in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **187**(3): 1114-1123.
- Huang, X., Dong, Y. and Zhao, J. (2004). HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *PNAS.* **101**(14): 4848–4853.
- Kallas, T., Coursin, T. and Rippka, R. (1985) Different organization of nif genes in nonheterocystous and heterocystous cyanobacteria. *Plant Mol. Biol.* **5**: 321-329.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, P.C., 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, A., Shimpo, A., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2001) Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**: 205-219.
- Khudyakov, I. Y. and Golden, J.W. (2004) Different functions of HetR, a master regulator of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120, can be separated by mutation. *PNAS* **101**(45): 16040-16045.
- Khudyakov, I. and 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**(22): 6971–6978.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Arch Hydrobiol Suppl* **82**: 247-345.
- Komárek, J. (1990) Guide to the Nomenclature and Formal Taxonomic Treatment of Oxiphototroph Procaryotes (Cyanoprokaryotes) Proposal.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (1999) *En: Cyanoprokaryota. 1.Teil: Chroococcales*. Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, Gustav Fischer Verl., 548 pp.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (2005) *En: Cyanoprokaryota. 2.Teil: Oscillatoriales*. Munchen, Germany, Elsevier GmbH, 759
- Korbee, N., Figueroa, F. L. y Aguilera, J. (2006) Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **79**: 119-132
- Laurent, S., Chen, H., Bédu, S., Ziarelli, F., Peng, L. and Zhang C.-C. (2005) Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *PNAS.* **102**(28): 9907-9912.
- Lee, H.-M., Flores, E., Forchhammer, K., Herrero, A. and Tandeau de Marsac, N. (2000) Phosphorylation of the signal transducer PII protein and an additional effector are required for the PII-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur. J. Biochem.* **267**: 591-600.
- Li, J.-H., Laurent, S., Konde, V., Bédu, S. and Zhang, C.C. (2003) An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiol.* **149**: 3257–3263.
- Madigan, M. T., Parker, J. and Martinko, J. M. (1999). Diversidad procariótica: dominio Bacteria. *En: Brock Biología de lo microorganismos* (pág. 654-658.). Prentice Hall Iberia. Capella. Madrid, España.

- Meeks, J. C. and Elhai, J. (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(1): 94-121.
- Misra, H. S. and Tuli, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant. Physiol.* **122**(3): 731-736.
- Moat, A. G.; Foster, J. W. and Spector, M. P. (2002) Ch. 12 Photosynthesis and Inorganic Metabolism. Pp. 434. *En: Microbial Physiology*, 4th ed., John Wiley & Sons inc. pub., USA.
- Montesinos, M. L., Herrero, A. and Flores, E. (1995). Amino Acid Transport Systems Required for Diazotrophic Growth in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**(11):3150-3157.
- Montesinos, M. L., Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. and 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**: 3163-31470.
- Mur, L. R., Skulberg, O.M. and Utkilen, H. (1999) Chapter 2: Cyanobacteria in the Environment. *En: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chorus, I. and Bartram, J (ed.) © WHO. E&FN Spon, Routledge, London, UK.
- Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. And Flores, E. (2001) Nitrogen-regulated group 2 sigma factor from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen stress. *J. Bacteriol.* **183**(3): 1090-1095.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D. K., and R. Malcolm Brown, R. M.(2001) Cellulose in Cyanobacteria. Origin of Vascular Plant Cellulose Synthase?, *Plant Physiol.* **127**(2):529–542.
- Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(5): 1895-1902.
- Paerl, H. W. and Steppe, T. F. (2003). Scaling up: the next challenge in environmental microbiology. *Environ. Microbiol.* **5**(11): 1025-38.
- Picossi, S., Valladares, A., Flores, E. And Herrero, A. (2004) Nitrogen-regulated Genes for the Metabolism of Cyanophycin, a Bacterial Nitrogen Reserve Polymer. *J. Biol. Chem.* **279**(19): 1582-11592.
- Rai, A., Söderbäck, E. and Bergman, B.. (2000) Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytol.* **147**: (3) 449-481.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. and Blankenship, R. E. (2004) The Natural History of Nitrogen Fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**(3): 541–554.

- Sherman, D. M., Tucker, D. and 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.
- Šmarda, J., Šmajš, D., Komrska, J. and Krzyžánek, V. (2002) S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron* **33**(3): 257-77.
- Soto-Urzúa, L. y Baca, B.E. (2001) Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Rev. Lat. Microbiol.* **43**: 37-49.
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic Prokaryotes: The cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**: 225-274.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L. and Meeks J. C. (2005) 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**(21): 6184–6194.
- Thajuddin, N. and Subramanian, G. (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* **89**: 1-10.
- Tomitani, A., Knoll, A., Cavanaugh, C. M and Ohno, T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS* **103**(14): 5442–5447.
- Torrecilla, I., Leganes, F., Bonilla, I. and Fernández-Piñas, F. (2004) A calcium signal is involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiol.* **150**(11): 3731-3739.
- Vazquez-Bermúdez, M. F., Herrero, A. and Flores, E. (2000) Uptake of 2-Oxoglutarate in *Synechococcus* Strains Transformed with the *Escherichia coli* *kgfP* Gene. *J. Bacteriol.* **182**(1): 211-215.
- Vazquez-Bermúdez, M. F., Herrero, A. and Flores, E. (2002) 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett.* **512**: 71-74.
- Vermaas, W. F. (2001) Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *En: Encyclopedia of life sciences.* Pág. 1-7. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group . sitio web: www.els.net
- Wacklin, P. (2006) Biodiversity and Phylogeny of Planktic Cyanobacteria in Temperate Freshwater Lakes. Academic Dissertation in Microbiology, Helsinki, 2006
- Wang, Q., LI, H. and Post A.F. (2000) Nitrate Assimilation Genes of the Marine Diazotrophic, Filamentous Cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain WH9601. *J. Bacteriol.* **182**(6): 1764–1767.

- Wilson, A., Ajlani G., Verbavatz, J. M., Vass, I., Kerfeld, C. A. and Kirilovsky, D. (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell*. **18**(4): 992-1007.
- Wolk, P., C. (1996) Heterocyst Formation. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 59–78.
- Wolk, P. C. (1973) Physiology and Cytological Chemistry of Blue-Green Algae. *Bact. Rev.* **37**(1): 32-101.
- Wu, X., Liu, D., Lee, M. H. and Golden, J. W. (2004) *patS* Minigenes Inhibit Heterocyst Development of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **16**(19): 6422-6429.
- Zhang C., C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L., and Bédu, S. (2006) MicroRev. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol. Microbiol.* **59**(2): 367–375.
- Zehr, J. P. and Jenkins, B. D. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* **5**(7): 539-54.
- Zhao, Y., Shi, Y., Zhao, W., Huang, X., Wang, D., Brown, N., Brand, J. and Zhao, J. (2005). CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation. *PNAS.* **102**(16): 5744-8.
- Zhou, R. and Wolk, C. P. (2003). A Two-component System Mediates Developmental Regulation of Biosynthesis of a Heterocyst Polysaccharide. *The J. Biol. Chem.* **278**(22): 19939–19946.

Sitios Web recomendados:

<http://www.algaebase.org/search/pictures/>

<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>

<http://hypnea.botany.uwc.ac.za/phylogeny/classif/cyan2.htm>

<http://textbookofbacteriology.net/procaryotes.html>

<http://www.wikipedia.org/>