

## Capítulo 2

### Las cianobacterias y su percepción del medio. Adaptación a la fuente de nitrógeno, cambios redox y metales pesados

Florencio FJ

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Avda Américo Vesputio 49, Universidad de Sevilla-CSIC, 41092 Sevilla; Tel: 9544489509; Fax: 954466006; CE: <florencio@us.es>*

#### RESUMEN

Las cianobacterias constituyen un grupo de bacterias con una cualidad singular, la de realizar una fotosíntesis oxigénica al igual que las plantas y algas. Su amplia diversidad y capacidad de adaptación han hecho que estos organismos ocupen con gran éxito nichos ecológicos muy diversos. El estudio de esta capacidad de adaptación mediante la utilización de algunas cianobacterias modelos, como es el caso de *Synechocystis* sp PCC 6803, han permitido estudiar a nivel molecular procesos tan importantes como la regulación del metabolismo del nitrógeno, especialmente el sistema de regulación de la glutamina sintetasa, la regulación redox, a través de las tiorredoxinas, o la resistencia a metales y metaloides. Los distintos procesos requieren de las cianobacterias de sistemas de percepción que permitan evaluar los cambios que se están produciendo en el medio y su posterior señalización para adaptarse a los mismos.

Palabras clave: glutamina sintetasa, tiorredoxina, arsénico.

#### Introducción

Las cianobacterias representan un grupo amplio de organismos fotosintéticos que muestran una amplia capacidad adaptativa al medio, su distribución tanto en ecosistemas de agua dulce como salina, le han hecho objeto de atención en su estudio, ya que constituyen un elemento básico de la productividad en los ecosistemas acuáticos, contribuyendo a la formación de biomasa, y a ser uno de los grupos de organismos principales en la fijación del dióxido de carbono, molécula de enorme importancia para el desarrollo de la biosfera, por sus implicaciones sobre el cambio climático. Nuestro grupo está desarrollando diversas líneas de investigación relacionadas con los sistemas que utilizan las cianobacterias en su adaptación al medio. En este contexto la señalización molecular de procesos como la asimilación del nitrógeno, la adaptación redox, o los mecanismos de resistencia o tolerancia a metales pesados son los que han centrado nuestra atención en los últimos años.

#### La señalización nutricional del estado nitrogenado en cianobacterias

La asimilación del amonio se lleva a cabo en cianobacterias por la ruta GS-GOGAT, (glutamina sintetasa-glutamato sintasa) en nuestro grupo de investigación se han clonado y caracterizado los correspondientes genes y proteínas de dicho sistema. En este contexto es de resaltar la existencia de 2 tipos de GS (GS tipo I y GS tipo III) diferentes en cianobacterias, con estructuras y regulación distintas así como la existencia también de dos GOGAT distintas, dependientes de distintos donadores de electrones (Muro-Pastor et al, 2005). Nuestro grupo ha diseccionado el mecanismo molecular que regula a la GS tipo I de *Synechocystis*, mediante la interacción de ésta con 2 proteínas de

pequeño tamaño, IF7 y IF17, se produce la inactivación de dicha enzima, cuando las condiciones nitrogenadas son ricas en formas reducidas, normalmente en presencia de amonio (García-Domínguez et al, 1999, 2000). A partir de estos estudios se ha puesto de manifiesto que el metabolito esencial en la señalización del estado nitrogenado en cianobacterias es el 2-oxoglutarato (Muro-Pastor et al, 2001). Bajos niveles de 2-oxoglutarato indican en la célula una suficiencia de nitrógeno y por tanto se produce la represión de los genes del metabolismo del nitrógeno y la inactivación de la GSI, y altos niveles de 2-oxoglutarato indican deficiencia de nitrógeno y por tanto activación de todos los sistemas de asimilación de nitrógeno en la célula (Muro-Pastor et al, 2001).

El esquema actual de señalización del estado nitrogenado quedaría formado por una cascada de transducción de señal, que se iniciaría en el nivel intracelular de 2-oxoglutarato, que permite su unión directa o indirecta al regulador transcripcional NtcA, dando lugar a la activación o represión de genes de la asimilación de nitrógeno. La expresión de los factores inactivantes IF7 e IF17 se encuentra también controlada por el regulador NtcA, y por lo tanto en último término por 2-oxoglutarato (Muro-Pastor et al, 2005). En nuestra hipótesis de trabajo la GSI sería el nodo central de acción del mecanismo de control de la asimilación de nitrógeno, y por tanto elucidar todos los elementos que controlan su función repercute directamente en la señalización del estado nitrogenado.

En la actualidad estamos centrados fundamentalmente en el análisis de los factores inactivantes y en el mecanismo que permite la reactivación de la GSI, incluyendo las señales metabólicas que disparan dicho proceso, en este sentido resultados recientes indican que el proceso de reactivación requiere una degradación específica de los factores inactivantes y que éste se lleva a cabo por

proteasas específicas (Galmozzi et al, 2007). Los estudios realizados con distintos mutantes de los factores inactivantes y de proteasas revelan que el proceso de reactivación requiere de la separación de los factores de la GSI y de su posterior degradación, igualmente la producción de dichos factores requiere de unas condiciones metabólicas adecuadas, de tal forma que puede existir la expresión de los genes correspondientes a dichos factores IF7 (*gifA*) y IF17 (*gifB*) pero no producir la proteína correspondiente, (Galmozzi et al, 2007) debido a la inestabilidad de dichos factores, por ejemplo en ausencia de su diana, GSI. En el futuro estamos interesados en determinar, mediante el análisis estructura-función y mutagénesis dirigida, los residuos críticos para la interacción y como ésta conlleva la pérdida de funcionalidad de la GSI.

### La señalización redox en cianobacterias

Dentro del estudio de los elementos que utilizan las cianobacterias en su adaptación a distintas condiciones fotosintéticas, sin duda la señalización redox ocupa un lugar central. Los componentes de dicho sistema se denominan hoy en día como *redoxinas* en los que se incluyen las tiorredoxinas y glutarredoxinas y los correspondientes sistemas de reducción. El estado redox celular se determina en gran parte por el estado de oxido-reducción de dichos compuestos que presentan todos ellos grupos tioles. El control redox en organismos fotosintéticos está ligado básicamente a la tasa del flujo de electrones fotosintéticos, que determina en última instancia la expresión de genes, la traducibilidad de transcritos y la regulación de distintas proteínas mediante fosforilación (Allen y Pfannschmidt, 2000, 2003; Zer y Ohad, 2003; Pfannschmidt y Liere, 2005).

Cómo la información acerca del flujo fotosintético de electrones se transduce en una señalización capaz de regular los distintos procesos es una cuestión no resuelta, aunque siempre se apunta a distintos mediadores redox, presentes tanto en cloroplastos como en cianobacterias, entre los cuales destacan el *pool* de plastoquinona, el glutatión y las tiorredoxinas. Estas últimas están ligadas al flujo fotosintético debido a que su reducción depende de ferredoxina a través de la ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR), que esta compuesta por dos subunidades FtrC y FtrV (Florencio et al, 2006).

Las tiorredoxinas son proteínas de un tamaño de unos 12 kDa, que presentan una secuencia de aminoácidos conservada en su sitio activo (WCGPC), requerida para la reacción de oxido-reducción que llevan a cabo. En cianobacterias existen al menos 4 tipos distintos. En el caso de *Synechocystis*, se han clonado y mutado los correspondientes genes por nuestro grupo (Florencio et al, 2006). El análisis de la expresión de los genes que codifican para las distintas tiorredoxinas de *Synechocystis* denominados: *trxA*, *trxB*, *trxC* y *trxQ* indica que su expresión está regulada por el estado redox de tal forma que al transferir los cultivos de luz a oscuridad en general existe una caída en la transcripción de dichos genes (Navarro et al, 2000).

Por otro lado, la utilización de compuestos que inducen estrés oxidativo en cianobacterias provocan un comportamiento específico de la expresión de las distintas tiorredoxinas de *Synechocystis*. Recientemente el análisis mediante microarrays de la expresión del genoma y estudios de proteómica tanto en cianobacterias como en cloroplastos han permitido establecer modelos globales de expresión génica por distintos tipos de condiciones ambientales, permitiendo con ello agrupar grandes grupos de genes en relación a procesos como cambios luz-oscuridad, interferencia del flujo fotosintético, etc (Hihara et al, 2001; Gill et al, 2002; Hihara et al, 2003).

En nuestro grupo, mediante una aproximación proteómica, se han determinado las interacciones in vitro de las distintas tiorredoxinas con objeto de encontrar las posibles dianas de cada una de ellas y obtener por tanto su mapa de interacciones (Lindahl y Florencio, 2003, 2004; Pérez-Pérez et al, 2006). Los resultados obtenidos con las distintas tiorredoxinas indican que estas son capaces de interactuar con proteínas implicadas en distintos procesos metabólicos, destacando especialmente los relacionados con el metabolismo del carbono, tanto en su fijación, como en su degradación vía glucólisis, o la síntesis degradación del glucógeno (Lindahl y Florencio, 2003, 2004; Pérez-Pérez et al, 2006).

### La resistencia a metales pesados y su percepción

El estudio de la acción de los metales pesados en el metabolismo de las cianobacterias es un proceso de gran interés, puesto que son organismos cuyo hábitat más frecuente es el medio acuático. Algunos metales pesados como  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  son necesarios para la catálisis de muchas reacciones redox, debido a su elevada densidad de carga que permite la polarización de los sustratos, pero por encima de ciertos niveles se convierten en cationes altamente tóxicos inhibiendo procesos esenciales para la vida como son la respiración o la fotosíntesis (Silver, 1996; Rosen, 2002; Cavet et al, 2003; Kupper y Kroneck, 2005).

Por otro lado, existen metales pesados como Cd, Pb, As y Hg que carecen de una función biológica, y que constituyen elementos altamente tóxicos para el desarrollo de la vida, especialmente en zonas donde existen explotaciones mineras o industrias que generan como residuos compuestos con estos metales, particularmente este es el caso de algunas zonas de Andalucía, donde recientemente ocurrió una contaminación masiva por dichos compuestos en la rotura de la balsa de las minas de Aznalcóllar.

Algunos microorganismos contienen baterías de genes implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de estos cationes. Estos genes se pueden clasificar en tres categorías: I) genes que codifican para sistemas de expulsión de los metales al exterior celular, II) genes que codifican para proteínas capaces de convertir los metales en formas menos tóxicas o más fácilmente eliminables y III) sistemas que son capaces de adsorber de una manera

específica o inespecífica los metales, retirándolos del medio (Silver, 1996).

Inicialmente hemos analizado una región que contiene una agrupación de genes que responden a distintos metales, concretamente a níquel, cobalto y zinc. Éste último metal ha sido estudiado en detalle por otro grupo (Cavet et al, 2003), mientras que nosotros hemos iniciado el estudio de los sistemas de resistencia a níquel y cobalto. Los resultados obtenidos sugieren un mecanismo que incluye un sistema de transporte específico hacia el exterior de ambos compuestos, y mutantes en dichos genes dan lugar a estirpes de *Synechocystis*, que presentan una mayor sensibilidad a dichos metales (García-Domínguez et al, 2000; López-Maury et al, 2002).

La agrupación de genes anteriormente citada, incluye también una serie de genes reguladores, tanto para el cobalto, como para el níquel, y otro sistema que responde específicamente al cobre, aunque dicho *cluster* no parece contener los genes responsables del sistema de expulsión de cobre. Los mecanismos por los que dichos reguladores son capaces de activar los genes que codifican para los sistemas específicos de resistencia son objeto de estudio en la actualidad, siendo de gran interés cómo los distintos metales, son percibidos del medio externo, en este sentido, al menos para el níquel y el cobre los sistemas de dos componentes a través de una histidina-quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) parecen los elementos iniciales de la cascada de señalización específica (García-Domínguez et al, 2000; López-Maury et al, 2002).

En la señalización de la presencia de níquel (los genes *nrsR* y *nrsS*, que codifican para un sistema de dos componentes de la familia *phoB*); uno de los genes codifica para una histidina quinasa (*nrsS*) y el segundo componente es una proteína de unión al ADN del tipo *PhoB* (*nrsR*). Mutantes en ambos genes impiden la transcripción del operón responsable de los genes de transporte hacia el exterior celular del níquel (López-Maury et al, 2002).

Además de los sistemas hasta ahora descritos, el genoma de *Synechocystis* contiene genes implicados en la resistencia a otros metales o metaloides, como el arsénico que también son de interés en el estudio de los sistemas de resistencia (Rosen, 2002). En el caso del arseniato el mecanismo de destoxicación es a través de su reducción a arsenito y la posterior eliminación del mismo al medio utilizando un transportador específico para este ión. Los estudios realizados en nuestro grupo indican la existencia de un operón que contiene los genes de la arseniato reductasa (*arsC*) así como del transportador de arsenito al exterior celular (*arsB*). Este operón se encuentra reprimido en ausencia de arseniato o arsenito en el medio, por el represor transcripcional *arsR* (López-Maury et al, 2003). Es también necesario señalar que aunque algunos de estos sistemas han sido estudiados en otros microorganismos, existen en cada uno de los operones de estos sistemas genes cuya función sigue siendo desconocida y por tanto su estudio debe permitir avanzar en el conocimiento de los distintos

sistemas de resistencia a dichos elementos.

El análisis de los tres sistemas descritos permitirá por tanto determinar el comportamiento de las cianobacterias a los cambios en el medio donde se encuentran y permitirá en el futuro construir sistemas precisos para poder monitorizar dichos cambios utilizando estirpes señalizadoras de dichas alteraciones en el medio, especialmente en ecosistemas acuáticos, por otro lado en el caso de los metales pesados se podrían utilizar estirpes que contengan sobreproducida algunas proteínas que pudiesen acumular eficazmente algunos de estos metales y por tanto ser utilizadas en procesos de biorremediación.

### Agradecimientos

Estos estudios han sido financiados por el MEC, Proyectos BMC2001-1735; BFU2004-0050 y por la Junta de Andalucía, Proyecto CVI-099; y grupo PAI CVI-284.

### Referencias

- Allen JF, Pfannschmidt T (2000): Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1351-1359.
- Cavet JS, Borrelly GP, Robinson NJ (2003): Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol Rev* 27: 165-181.
- Florencio FJ, Pérez-Pérez ME, López-Maury L, Mata-Cabana A, Lindahl M (2006): The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosynth Res* 89: 157-171.
- Galmozzi CV, Fernandez-Avila MJ, Reyes JC, Florencio FJ, Muro-Pastor MI (2007): The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated in vivo by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Mol Microbiol* 65: 166-179.
- García-Domínguez M, López-Maury L, Florencio FJ, Reyes JC (2000): A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 182: 1507-1514.
- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ (1999): Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7161-7166.
- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ (2000): NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 35: 1192-1201.
- Gill RT, Katsoulakis E, Schmitt W, Taroncher-Oldenburg G, Misra J, Stephanopoulos G (2002): Genome-wide dynamic transcriptional profiling of the light-to-dark transition in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 184: 3671-3681.
- Hihara Y, Kamei A, Kanehisa M, Kaplan A, Ikeuchi M (2001): DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13: 793-806.
- Hihara Y, Sonoike K, Kanehisa M, Ikeuchi M (2003): DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp.

- strain PCC 6803. *J Bacteriol* 185: 1719-1725.
- Kupper H, Kroneck PM (2005): Heavy metal uptake by plants and cyanobacteria. *Met Ions Biol Syst* 44: 97-144.
- Lindahl M, Florencio FJ (2003): Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 16107-16112.
- Lindahl M, Florencio FJ (2004): Systematic screening of reactive cysteine proteomes. *Proteomics* 4: 448-450.
- Lopez-Maury L, Florencio FJ, Reyes JC (2003): Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 185: 5363-5371.
- Lopez-Maury L, Garcia-Dominguez M, Florencio FJ, Reyes JC (2002): A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 43: 247-256.
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2001): Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J Biol Chem* 276: 38320-38328.
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2005): Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* 83: 135-150.
- Navarro F, Martin-Figueroa E, Florencio FJ (2000): Electron transport controls transcription of the thioredoxin gene (*trxA*) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 43: 23-32.
- Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Lindahl M (2006): Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: Target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* 6 Suppl 1: S186-195.
- Pfannschmidt T (2003): Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8: 33-41.
- Pfannschmidt T, Liere K (2005): Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxid Redox Signal* 7: 607-618.
- Rosen BP (2002): Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529: 86-92.
- Silver S (1996): Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene* 179: 9-19.
- Zer H, Ohad I (2003): Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. *Trends Biochem Sci* 28: 467-470.