



Facultad de Ciencias  
Universidad de Córdoba

**Desarrollo de estrategias moleculares para el estudio de la asimilación  
de nitrato en algas**



*María Teresa Navarro Gochicoa*  
Córdoba, 1998

# Índice

INTRODUCCIÓN	1
Asimilación de nitrato: visión general	2
Sistemas de transporte de nitrato	5
Reducción de nitrato a nitrito	7
Reducción de nitrito	9
Mutantes de asimilación de nitrato y regulación de la ruta	11
Objetivos	18
MATERIALES y MÉTODOS	21
1. Organismos empleados. Medios y condiciones de cultivo.	22
1.1 Estirpes bacterianas.	22
1.1.1 Medios de cultivo.	22
1.1.2 Condiciones de cultivo.	22
1.2 Estirpes de hongos.	23
1.2.1 Medios de cultivo.	23
1.2.2 Condiciones de cultivo.	24
1.3 Estirpes de <i>C. reinhardtii</i> .	24
1.3.1 Medios de cultivo.	25
1.3.2 Condiciones de cultivo.	26
1.3.2.1 Cultivos con luz continua.	26
1.3.2.2 Cultivos sincronizados (luz/oscuridad).	26
2. Determinación de actividades enzimáticas.	26
2.1 Actividad NAD(P)H- Nitrato reductasa.	26
2.2 Actividad BVH- Nitrato reductasa.	27
2.3 Actividad MVH- Nitrito reductasa.	27
2.4 Actividad MoCo.	28
2.4.1 Tampones empleados en el ensayo <i>nit-1</i> .	28
2.4.2 Extractos <i>nit-1</i> de <i>Neurospora crassa</i> .	29
2.4.3 Extractos de <i>C. reinhardtii</i> .	29
2.4.4 Ensayo de actividad MoCo.	29
2.5 Actividad de consumo de nitrato y nitrito.	30
2.5.1 Actividad de consumo de nitrato.	30
2.5.2 Actividad de consumo de nitrito.	30
3. Métodos analíticos.	30

3.1	Determinación del crecimiento celular y clorofila.	30
3.2	Determinación de amonio.	30
3.3	Determinación de nitrito.	31
3.4	Determinación de proteínas.	31
4.	Electroforesis de proteínas.	32
4.1	SDS-PAGE.	32
4.2	Electroforesis en condiciones nativas.	32
4.3	Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.	33
4.4	Tinción de actividad xantina deshidrogenasa.	33
5.	Técnicas inmunoquímicas. Inmunodetección en filtros (western blotting).	33
5.1	Electrotransferencia de proteínas.	33
5.2	Tinción de proteínas en nitrocelulosa.	33
5.3	Inmunodetección específica de Fd-NiR.	34
6.	Técnicas de clonación molecular. Manipulación de moléculas de DNA.	35
6.1	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .	35
6.2	Fraccionamiento de moléculas de DNA y purificación de fragmentos de restricción.	35
6.3	Rellenado de extremos cohesivos de moléculas de DNA.	36
6.4	Desfosforilación de extremos de moléculas de DNA.	36
6.5	Ligación de moléculas de DNA.	37
6.6	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .	37
7.	Plásmidos utilizados.	37
7.1	Plásmidos nativos.	37
7.2	Plásmidos recombinantes.	38
8.	Aislamiento de DNA plasmídico (doble cadena) de <i>E. coli</i> .	38
8.1	Minipreparación de DNA plasmídico mediante lisis alcalina.	39
8.2	Minipreparación de DNA plasmídico mediante columna.	39
8.3	Minipreparación de DNA plasmídico mediante precipitación con PEG.	39
8.4	Maxipreparación de DNA plasmídico.	40
9.	Cuantificación de ácidos nucleicos.	41
10.	Marcaje radioactivo de moléculas de DNA y RNA.	41
10.1	DNA.	41
10.2	RNA.	42
11.	Aislamiento de DNA genómico de <i>C. reinhardtii</i> .	44
11.1	Maxipreparación de DNA genómico de alta calidad.	44

11.2	Minipreparación de DNA genómico.	44
12.	Fraccionamiento, transferencia y condiciones de hibridación de DNA genómico de <i>C. reinhardtii</i> .	45
12.1	Fraccionamiento.	45
12.2	Transferencia.	45
12.3	Condiciones de hibridación.	46
13.	Aislamiento de RNA de <i>C. reinhardtii</i> .	47
14.	Fraccionamiento, transferencia y condiciones de hibridación de RNA de <i>C. reinhardtii</i> .	
14.1	Fraccionamiento.	48
14.2	Transferencia.	48
14.3	Condiciones de hibridación.	48
15.	Método de detección de mRNA específicos.	49
16.	Análisis genético de estirpes de <i>C. reinhardtii</i> .	50
16.1	Complementación <i>in vivo</i> (obtención de diploides).	50
16.2	Análisis de segregantes obtenidos por cruce genético.	50
17.	Mutagénesis en medios con clorato.	51
18.	Transformación de células de <i>C. reinhardtii</i> .	51
19	Obtención de autolisina de <i>C. reinhardtii</i> .	52
20	Otras técnicas.	53
20.1	Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.	53
20.2	Secuenciación de DNA.	53
20.3	Actividad fotosintética. Electrodo de O <sub>2</sub> .	53
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN I</b>	<b>55</b>
	<b>Construcción y caracterización de mutantes de NiR</b>	
	<b>RESULTADOS</b>	
	- Construcción de mutantes de NiR	56
	- Caracterización de las estirpes M1, M2, M3 y M4	58
	<b>DISCUSIÓN I</b>	<b>65</b>
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN II</b>	<b>67</b>
	<b>Construcción de vectores de expresión para la complementación de mutantes de <i>C. reinhardtii</i> con genes heterólogos de plantas</b>	

RESULTADOS II	
- Complementación de mutantes de <i>C. reinhardtii</i> con genes heterólogos de plantas	68
- Construcción de un vector de expresión del gen <i>Bch1</i> de cebada en <i>C. reinhardtii</i>	70
- Construcción de un vector de expresión de NR de tabaco en <i>C. reinhardtii</i>	70
- Construcción de un vector de expresión de la NiR de espinacas en <i>C. reinhardtii</i>	71
- Estudios de complementación	72
- Complementación de la estirpe S10 HANT <sup>-</sup> de <i>C. reinhardtii</i>	73
- Complementación de mutantes de NR	74
- Complementación de mutantes de NiR	74
DISCUSIÓN II	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN III	78
<b>Estudio de estirpes de <i>C. reinhardtii</i> que expresan la NR constitutiva</b>	
RESULTADOS III	
- Expresión de los HANT y de la NR en la estirpe Tx11-8	79
- Obtención de estirpes deficientes en los sistemas HANT y que expresen constitutivamente la NR	84
- Reversión del fenotipo de CSA en estirpes que contienen el gen quimérico <i>CabII-1-Nia1</i>	86
- Análisis genético de los mutantes CRA derivados de la estirpe Tx11-8	90
- Expresión de los transcritos de <i>Nia1</i> , <i>Nrt2;1</i> y <i>Nar2</i> en las estirpes CRA-Tx11-8 correspondientes a los grupos 1, 2 y 3	93
- Actividad de los HANT/HANiT en las estirpes CRA del grupo 1, 2 y 3	94
- Caracterización de la estirpe 23c <sup>+</sup> (CRA-Tx11-8)	97
DISCUSIÓN III	107
CONCLUSIONES	112
BIBLIOGRAFÍA	114

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Aurora Galván Cejudo y el Dr. Emilio Fernández Reyes, a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento por sus enseñanzas

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de los Proyectos de Investigación BIOTEC CEE PL 920250, BIO4-CT97-2231, J.A.(CVI 0158) y DGICYT (PB95-0554-CO-01).

## Índice de figuras

FIGURA 0	Imagen de la portada tomada de: <a href="http://www.swmed.edu/home-pages/chlamy/1998chlamy.html">http://www.swmed.edu/home-pages/chlamy/1998chlamy.html</a>	I
FIGURA 1	Imagen al microscopio óptico del alga <i>Chlamydomonas</i> .	3
FIGURA 2	Esquema de la ruta de asimilación de nitrato en <i>C. reinhardtii</i> : genes implicados en la misma y sus productos proteicos.	5
FIGURA 3	Árbol filogenético según las comparaciones de secuencias de las NR de hongos, algas y plantas superiores (adaptado de Zhou y Kleinhofs, 1996)	8
FIGURA 4	Obtención de ribosondas específicas para los genes <i>Nar2</i> , <i>Nrt2;1</i> y <i>Nrt2;2</i> .	43
FIGURA 5	Cruce genético entre las estirpes G1 y 04-1.	57
FIGURA 6	Expresión de los transcritos de <i>Nrt2;1</i> y <i>Nar2</i> .	57
FIGURA 7	Análisis de inmunodetección de la expresión de la proteína fd-NiR.	58
FIGURA 8	Actividad de consumo de nitrato y excreción de nitrito de las estirpes M1, M2, M3, M4 y WT (6145c).	59
FIGURA 9	Actividad de expresión de excreción de nitrito en las estirpes M1, M2, M3 y M4 en medios con diferentes concentraciones de nitrato.	60
FIGURA 10	Expresión de la actividad BVH-NR en las estirpes silvestre, 305cw15 y M3 en medios sin nitrógeno o con nitrato 4 mM.	61
FIGURA 11	Expresión de los transcritos de <i>Nia1</i> , <i>Nrt2;1</i> , <i>Nrt2;2</i> y <i>Nar2</i> en los mutantes de NiR (M1, M2 y M4), mutante de NR (305cw15) y mutante de los sistemas de transporte de alta afinidad de NT (S10).	62
FIGURA 12	Actividad NADH-NR de las estirpes S10 y M4, en ausencia/presencia de ferricianuro.	64
FIGURA 13	Construcción del vector de expresión receptor.	69
FIGURA 14	Plásmido pCSL16 linealizado que contiene la NR de tabaco (Adaptado de Vauchert et al., 1989).	71
FIGURA 15	Excreción de nitrito de la estirpe Tx11-8 a partir de nitrato 100 $\mu$ M en presencia de amonio.	80
FIGURA 16	Expresión de los transcritos de <i>Nia1</i> , <i>Nrt2;1</i> , <i>Nrt2;2</i> y <i>Nar2</i> en las estirpes silvestre, 305cw15 y Tx11-8.	81

FIGURA 17	Expresión de los transcritos de <i>Nia1</i> , <i>Nrt2;1</i> , <i>Nrt2;2</i> y <i>Nar2</i> en células de la estirpe Tx11-8. Efecto de la luz y del nitrato.	83
FIGURA 18	Obtención de mutantes HANT <sup>-</sup> :: <i>CabII-1-Nia1</i> mediante cruce genético entre las estirpes Tx11-8 y G1.	84
FIGURA 19	Excreción de nitrito a partir de nitrato en las estirpes NRcG1-2, NRcG1-9, NRcG1-12 NRcG1-17.	85
FIGURA 20	Efecto del amonio en la excreción de nitrito a partir de nitrato en las estirpes NRcG1-2 y NRcG1-12.	86
FIGURA 21	Expresión del transcrito de <i>CabII-1-Nia1</i> en los mutantes espontáneos CRA de las estirpes Tx11-8 y NRcG1.	87
FIGURA 22	Actividad xantina deshidrogenasa de las estirpes CRA (12a <sup>+</sup> , 5b <sup>+</sup> , 27b <sup>+</sup> , 1b <sup>-</sup> , 13b <sup>-</sup> y 17b <sup>-</sup> ), Tx11-8 y estirpe silvestre (WT).	90
FIGURA 23	Expresión de los transcritos <i>Nia1</i> , <i>Nrt2;1</i> y <i>Nar2</i> en las estirpes CRA-Tx11-8.	94
FIGURA 24	Consumo de nitrato por las estirpes CRA-Tx11-8-Nit <sup>+</sup> .	96
FIGURA 25	Consumo de nitrato por las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> .	97
FIGURA 26	Consumo de nitrito por las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> .	98
FIGURA 27	Inducción de la actividad BVH-NR en las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> en distintos medios de cultivo.	99
FIGURA 28	Inducción de la actividad BVH-NR en las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> en distintos medios de cultivo.	98
FIGURA 29	Excreción de nitrito en células adaptadas a la luz y sincronizadas de las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> .	100
FIGURA 30	Crecimiento de las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> en medios sólidos con nitrato 4 mM en luz continua (A) o cultivos sincrónicos (12 h luz/12h oscuridad) (B).	101
FIGURA 31	Crecimiento de las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> en medios líquidos con diferentes medios y en condiciones de luz continua o sincronizadas.	102
FIGURA 32	Análisis del efecto protector del Cl <sup>-</sup> frente a la toxicidad del clorato en las estirpes Tx11-8, 23c <sup>+</sup> y NRcG1-(2, 9, 12 y 17) en medios con amonio.	104
FIGURA 33	Efecto del inhibidor NPPB en el crecimiento de las estirpes Tx11-8,	105

23c<sup>+</sup> y NRcG1-(2, 9, 12 y 17).

FIGURA 34 Efecto del Cl<sup>-</sup> y del inhibidor NPPB en la excreción de nitrito al medio en las estirpes Tx11-8 y en el mutante (Niit<sup>-</sup>/HANT) NRcG1-2. 106



## Índice de tablas

TABLA I	Nomenclatura y función de genes que participan en la asimilación de nitrato en <i>C. reinhardtii</i> de acuerdo con la ISPMB	14
TABLA II	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	22
TABLA III	Estirpes de <i>C. reinhardtii</i> utilizadas	24
TABLA IV	Actividades de consumo de nitrato y excreción de nitrito y NiR en los mutantes de NiR y la estirpe silvestre 6145c	59
TABLA V	Expresión de las actividades BVH-NR en las estirpes M1, M2, M3 y M4 en medios con diferentes concentraciones de nitrato	63
TABLA VI	Estudios de complementación de mutantes de <i>C. reinhardtii</i> mediante transformación y su eficiencia.	73
TABLA VII	Actividad NiR de espinacas expresada en <i>E. coli</i>	75
TABLA VIII	Actividad BVH-NR, sensibilidad a clorato y excreción de nitrito en las estirpes Tx11-8 y NRcG1 y los revertientes espontáneos derivados de ellas	87
TABLA IX	Actividad BVH-NR, NADH-NR y MoCo en las estirpes Nit <sup>+</sup> CRA-Tx11-8	89
TABLA X	Clasificación de las estirpes CRA-Tx11-8	90
TABLA XI	Cruce genético entre las estirpes CRA-Tx11-8 y la estirpe 305d	91
TABLA XII	Cruce genético entre las estirpes 23c <sup>+</sup> y 1c <sup>+</sup> con la estirpe G1	92
TABLA XIII	Complementación mediante obtención de diploides de mutantes afectados en genes relacionados en la biosíntesis del MoCo de <i>C. reinhardtii</i>	93
TABLA XIV	Características de los sistemas HANT y HANiT identificados en <i>C. reinhardtii</i>	95
TABLA XV	Velocidades de consumo de nitrito de las estirpes CRATx11-8-Nit <sup>-</sup>	95
TABLA XVI	Velocidades de consumo de nitrito de las estirpes Nit <sup>+</sup> CRA.Tx11-8	97
TABLA XVII	Actividad fotosintética en las estirpes Tx11-8 y 23c <sup>+</sup> en diferentes medios y condiciones de cultivo	103

## Abreviaturas

A	Absorbancia
APS	Persulfato amónico
ATA	Aurintricarbonato
ATP	Adenosín trifosfato
BV	Bencil viológeno
BVH	Bencil viológeno reducido
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
Chl	Clorofila
Ci	Curio
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
c.p.m.	Cuentas por minuto
CR	Clorato resistente
CRA	Clorato resistente en presencia de amonio
CSA	Clorato sensible en presencia de amonio
CTP	Citidín trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FCI	Fenol/cloroformo/isoamilalcohol
Fd	Ferredoxina
g	Aceleración de la gravedad
GOGAT	Oxoglutarato aminotransferasa
GS	Glutamina sintetasa
GTP	Guanosín trifosfato
HANiT	Transportadores de nitrito de alta afinidad
HANT	Transportadores de nitrato de alta afinidad
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactósido
kDa	Kilodalton

K <sub>m</sub>	Constante Michaelis Menten
LANT	Transportador de nitrato de baja afinidad
LB	Medio Luria-Bertani (cultivo de microorganismos)
Mo	Molibdeno
MoCo	Cofactor de molibdeno
MoCoCP	Proteína transportadora del cofactor de molibdeno
MOPS	Ácido 3(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
mt <sup>+/-</sup>	Sexo +/-
MV	Metil viológeno
NAD(P)H	Nicotin adenín dinucleótido (fosfato) reducido
NBT	Cloruro de p-nitroazul de tetrazolio
nd	No detectable
ND	No determinado
Niit <sup>+/-</sup>	Crecimiento positivo/negativo en medios con nitrito
NiR	Nitrito reductasa
Nit <sup>+/-</sup>	Crecimiento positivo/negativo en medios con nitrato
NNEDA	Solución de N-naftiletildiamina
NPPB	Ácido 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico
NR	Nitrato reductasa
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
pBSK/KS	Plásmido Bluescript SK/KS
PCR	Acción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMS	Fenacina metosulfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prot	Proteína
p/v	Peso/volumen
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Solución de citrato sódico y cloruro sódico

SULFA	Solución de sulfanilamida ácida
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tampón Tris-ácido bórico-EDTA
TBS	Tampón Tris-cloruro sódico
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TN	Transporte de nitrato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UTP	Uridín trifosfato
v/v	Volumen/volumen
vol	Volumen
WT	Tipo silvestre
X-gal	5-Bromo, 4-Cloro, 3-Indolil $\beta$ -galactósido

## **INTRODUCCIÓN**

Los elementos nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y carbono son esenciales para los seres vivos ya que forman parte de las proteínas, los ácidos nucleicos y las vitaminas, así como de numerosos productos intermediarios del metabolismo. La capacidad de fijación biológica del dinitrógeno está restringida a microorganismos procarióticos y a ciertas plantas capaces de establecer simbiosis con ellos, en donde la enzima nitrogenasa cataliza la transferencia de electrones al dinitrógeno. Sin embargo, la fuente de nitrógeno para la mayoría de bacterias, hongos, algas y plantas procede de la reducción de nitrato. La ruta de asimilación de nitrato es el proceso cuantitativamente más importante en la adquisición de nitrógeno en la biosfera. Se ha estimado que más de  $10^4$  megatoneladas de nitrógeno nítrico son asimiladas al año por estos organismos. Esta cantidad supone unas 100 veces la cantidad de nitrógeno asimilada mediante la fijación de nitrógeno atmosférico (Guerrero et al., 1981).

El abuso en la utilización de los abonos nitrogenados con el objeto de aumentar el rendimiento agrícola está conduciendo a problemas tanto ecológicos como de salud pública. El nitrógeno reducido de los fertilizantes, como urea ó sales amónicas, se aplica directamente a las tierras de cultivo, donde en su mayor parte se transforma en nitrato por los microorganismos del suelo. Aunque el exceso de nitrato puede perderse por desnitrificación, generando óxidos de nitrógeno que contaminan la atmósfera, también puede ser lixiviado del suelo y acumularse en las aguas continentales u oceánicas.

La UE trata de restringir el uso abusivo de estos abonos nitrogenados y de controlar el contenido de nitrato/nitrito en las aguas y alimentos de origen vegetal, debido a su toxicidad para los humanos a concentraciones relativamente bajas. El conocimiento a nivel tanto bioquímico como molecular de los elementos estructurales y reguladores de la ruta de asimilación de nitrato en plantas constituye un primer paso para la correcta manipulación molecular de dicha ruta. Este conocimiento tendría como fin la mejora genética de vegetales que reduzcan el nitrato acumulado y que lo asimilen eficientemente y en definitiva encontrar soluciones al impacto ecológico negativo producido por la utilización de fertilizantes nitrogenados (Campbell y Kinghorn, 1990; Crawford, 1995).

El alga verde *C. reinhardtii* se utiliza como organismo modelo para el estudio molecular de la ruta asimiladora de nitrato, debido a que ofrece grandes ventajas (Harris, 1989):

- *C. reinhardtii* es un organismo eucariota fotosintético unicelular, haploide, con un tiempo de generación corto (5-6 h), lo que permite una fácil disponibilidad de células.

- Se dispone de mutantes afectados en la ruta de asimilación de nitrato y estrategias sencillas de generación de nuevos mutantes (Prieto y Fernández, 1993).
- Se pueden realizar estudios genéticos por análisis de tetradas o al azar y generar diploides estables.
- Posee un genomio de tamaño pequeño de menos de  $10^8$  pb y un mapa genético bien caracterizado.
- Se dispone de técnicas eficientes de transformación de genes nucleares (Kindle, 1990; Shimogawara et al., 1998) y cloroplásticos (Zumbrunn et al., 1989), lo que junto al corto tiempo de generación permite obtener resultados a corto tiempo en contraposición con las técnicas de transformación en plantas superiores. Estas técnicas de transformación se han usado tanto para la expresión de genes homólogos como heterólogos. La complementación de mutantes con genes nucleares homólogos se ha realizado utilizando entre otros, el gen *Nia1* que codifica para la nitrato reductasa (Fernández et al., 1989) y el gen *Arg-7* que codifica para la arginosuccinatoliasa (Debuchy et al., 1989). En cuanto a la transformación con genes heterólogos, se ha utilizado como marcador seleccionable un gen bacteriano (*Ble*), que confiere resistencia al antibiótico fleomicina fusionado con las regiones promotoras y 3' no traducidas del gen nuclear *RbcS2* de *C. reinhardtii* (Stevens et al., 1996).



Fig.1. Imagen al microscopio óptico del alga *Chlamydomonas* (Adaptado de <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/chlamy/appearance/html>)

Las características descritas nos indican que *C. reinhardtii* podría ser un organismo modelo en el estudio de la funcionalidad de genes heterólogos, utilizando mutantes apropiados para su complementación. Sin embargo, trabajos previos muestran la dificultad de las transformaciones heterólogas. Así la complementación del mutante *arg-7* con el gen *Arg4* de levaduras dio como resultado transformantes inestables (Rochaix y Van Dillewijn, 1982).

Estudios recientes sobre la expresión de un gen bacteriano *aadA* bajo el control de las regiones reguladoras 5' y 3' del gen nuclear *RbcS2* de *C. reinhardtii*, que confiere resistencia a espectinomicina, revelan el silenciamiento de genes integrados por transformación nuclear. Este silenciamiento corresponde a una supresión a nivel transcripcional que no se corresponde con metilaciones del DNA integrado, postulándose un posible papel regulador de la heterocromatina en la inactivación transcripcional (Cerutti et al., 1997).

La integración de genes nucleares en el genoma de *C. reinhardtii* es al azar, si bien se ha demostrado la existencia de recombinación homóloga en el núcleo que oscila entre 0,1 y 1% (Sodeinde y Kindle, 1993).

La ruta de asimilación de nitrato es un proceso altamente regulado en el que se distinguen tres etapas independientes. El primer paso es la entrada de nitrato al interior de la célula mediado por transportadores específicos (TN). A continuación, el nitrato es reducido hasta amonio, por la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa (NR) que cataliza la reducción de nitrato a nitrito con la transferencia de dos electrones, y la nitrito reductasa (NiR) que cataliza la reducción de nitrito a amonio con la transferencia de seis electrones. Las actividades catalíticas, así como la regulación génica de estas enzimas, han sido ampliamente estudiadas en hongos, algas y plantas superiores (Guerrero et al., 1981; Kinghorn y Campell, 1989; Crawford, 1995; Fernández et al., 1998). Posteriormente el amonio se incorpora a esqueletos carbonados a través del ciclo GS-GOGAT, que implica la acción secuencial de la glutamina sintetasa (GS), que cataliza la incorporación de amonio al glutamato, y de la glutamato sintasa (GOGAT) que cataliza la transferencia reductiva del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato para dar dos moléculas de glutamato (Hoff et al., 1994).

En la figura 2, se muestra un esquema del proceso de asimilación de nitrato en *C. reinhardtii* así como de los genes involucrados en la misma y que a continuación se detallan. En resumen, dichos genes se encuentran en dos agrupaciones. Una de aproximadamente 45 kb, en la que se han identificado seis genes regulados por nitrato y otra de unas 14 kb en la que al menos parece existir 2 genes regulados por nitrato.



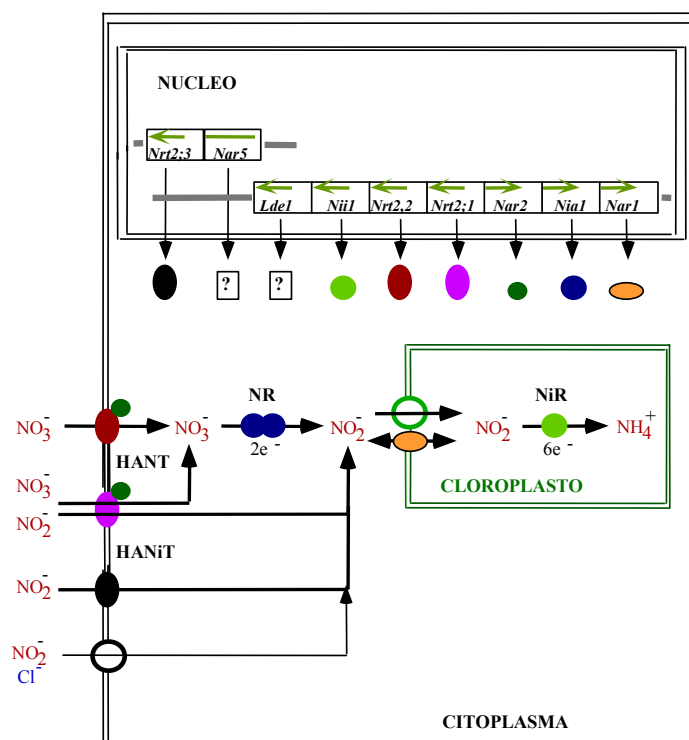


Fig.2. Esquema de la ruta de asimilación de nitrato en *C. reinhardtii*: genes implicados en la misma y sus productos proteínicos.

### Sistemas de transporte de nitrato.

Un paso clave en la ruta de asimilación de nitrato/nitrito debe ocurrir en la primera etapa, el transporte, ya que la cantidad de nitrato/nitrito que entra al interior de la célula debe estar sincronizada con la capacidad de metabolizarlo y asimilarlo. De otro modo, la excreción de compuestos nitrogenados reducidos supondría un gasto extra de energía (Hoff et al., 1994; Crawford, 1995; Fernández et al., 1998).

Tanto en *C. reinhardtii* como en plantas superiores, se han descrito cinéticas bifásicas de transporte de nitrato, atribuibles a sistemas de transporte de alta afinidad (HANT) inducibles por nitrato, y a sistemas de transporte de baja afinidad (LANT) que son constitutivos (Siddiqi et al., 1990; Watt et al., 1992; Tsay et al., 1993; Wang y Crawford, 1996).

En *C. reinhardtii* se han descrito, bioquímica y molecularmente, tres sistemas de transporte de alta afinidad para nitrato y/o nitrito: el Sistema I, codificado por *Nrt2;1* y *Nar2* que es biespecífico para nitrato y nitrito, el Sistema II, codificado por *Nrt2;2* y *Nar2* que es específico de nitrato; y el Sistema III, específico de nitrito y posiblemente codificado por *Nrt2;3* (Galván et al., 1996; Quesada et al., 1998b; Rexach et al., 1998). Básicamente, las características de estos sistemas de transporte son: i) tienen un valor de  $K_m$  en el rango micromolar (Galván et al., 1996); ii) se reprimen por amonio, se inducen por nitrato y están bajo control del gen regulador *Nit2* (Galván et al., 1992; Quesada et al., 1994; Quesada et al., 1998b); y iii) se bloquean por amonio y requieren  $CO_2$  para tener actividad máxima (Galván et al., 1991; Quesada et al., 1993, Galván et al., 1996; Rexach et al., 1998). Ya que el nitrito se reduce hasta amonio en el interior del cloroplasto (Fischer y Klein, 1988), deben existir además sistemas de transporte para nitrito tanto en la membrana plasmática como en la envuelta del cloroplasto. Sin embargo, los tres sistemas que se han descrito anteriormente parecen operar en la membrana plasmática.

Los genes de *C. reinhardtii* *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nrt2;3* muestran entre sí una elevada identidad en sus secuencias de DNA y las deducidas de aminoácidos (Quesada et al., 1994; Quesada et al., 1998b). *Nrt2;1*, cuyo cDNA se ha secuenciado completamente, codifica para una proteína integral de membrana de unos 59 kDa con 12 regiones transmembrana, típicas de proteínas formadoras de canales (Quesada et al., 1994; Trueman et al., 1996). La función precisa de *Nar2* (también denominado *Nit8*, Nelson y Lefebvre, 1995) en los sistemas de transporte I y II se desconoce. Recientemente se ha demostrado actividad de transporte de nitrato en oocitos de *Xenopus*, sólo cuando hay coexpresión de los cDNA de *Nar2* (*Nit8*) y *Nrt2;1*, pero no cuando se expresan cada uno de estos genes individualmente (Miller A, comunicación personal). Esto parece indicar una función estructural de *Nar2* en estos sistemas de transporte, si bien tampoco se puede descartar un papel regulador.

Se han identificado genes relacionados con el transporte de nitrato/nitrito en bacterias, cianobacterias, hongos y plantas superiores (Omata et al., 1993; Trueman et al., 1996; Fernández et al., 1998). En resumen, dichos transportadores se agrupan en una serie de familias.

Primero, aquellos transportadores que pertenecen a la familia de los genes *Nrt2*, entre los que se encuentran los descritos en *C. reinhardtii* (*Nrt2;1*, *Nrt2;2*, *Nrt2;3*), el gen *CrnA* identificado en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Jonhstone et al., 1990; Unkles et al., 1991), *YNT1* en *Hansenula anomala* (Pérez et al., 1997); los genes *Bch1* y *Bch2* identificados en cebada (Trueman et al., 1996), el gen *Nrt2;INp* identificado en *Nicotiana*

*plumbaginifolia* (Quesada et al., 1997) y el gen *NarK* identificado en *E. coli* (Kolesnikov et al., 1992). Estos genes se engloban dentro de la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily) entre los que se incluyen genes de resistencia a multidroga y transportadores de soluto tanto de procariotas como eucariotas.

Segundo, la superfamilia de transportadores de nitrato de tipo ABC identificados en cianobacterias (Omata et al., 1993; Merchan et al., 1995a) y que no muestran homología con los *Nrt2*.

Tercero, los genes del tipo *Chl1*, identificados primero en *Arabidopsis* (Tsay et al., 1993), que se han relacionado con transportadores de nitrato de baja afinidad, no muestran homología con ninguno de los tipos anteriores, y se les considera miembros de la superfamilia de transportadores POT (Proton-dependent Oligopeptide Transporter) (Trueman et al., 1996).

### **Reducción de nitrato a nitrito.**

La reducción de nitrato a nitrito está catalizada por la enzima nitrato reductasa (NR) con la transferencia de dos electrones. La NR asimiladora es una proteína multiredox soluble que utiliza piridín nucleótidos como fuente de poder reductor. Se ha descrito la existencia de tres formas relacionadas de NR: NADH-NR (EC 1.6.6.1), NAD(P)H-NR (EC 1.6.6.2) y NADPH-NR (1.6.6.3). La NADH-NR es la forma más común en plantas y algas como *Chlorella*, aunque en la mayoría de algas eucariotas la forma predominante es la NAD(P)H-NR (Sosa y Cárdenas, 1977), que también se encuentra en algunas plantas como una segunda isoforma mayoritaria en raíces. Sin embargo, en hongos la forma predominante es la NADPH-NR (Caboche y Rouzé, 1990).

La NR de organismos eucariotas es un homodímero en el que cada subunidad consiste en un polipéptido de unos 100 kDa que contiene tres grupos prostéticos: FAD, hemo y cofactor de molibdeno (MoCo), localizados en tres dominios funcionales. La región MoCo localizada en el dominio amino terminal, la región hemo en medio y la región FAD en el carboxilo terminal (Zhou y Kleinhofs, 1996). El complejo enzimático de la NR muestra dos actividades parciales denominadas diaforasa (NAD(P)H-citocromo c reductasa) y NR terminal (FADH<sub>2</sub>-NR o viológeno reducido-NR) que comprenden diferentes dominios proteicos (Franco et al., 1984; Hoff et al., 1994). Los genes que codifican para la nitrato reductasa de un gran número de organismos se han secuenciado parcial o totalmente (Wray y Kinghorn, 1989; Zhou y Kleinhofs, 1996). Las comparaciones de las secuencias de las NR de hongos, algas y plantas,

así como de otras reductasas de mamíferos y levaduras han permitido la localización de los distintos dominios de la proteína (Fernández et al., 1989; Campbell y Kinghorn, 1990). El dominio que muestra mayor grado de identidad entre las diferentes NR es la zona de unión del cofactor de molibdeno (Zhou y Kleinhofs, 1996).

Para entender los mecanismos de evolución y relación entre las NR se ha realizado un árbol filogenético basado en la comparación de secuencias completas de 19 NR de 16 especies de hongos, algas y plantas superiores (Zhou y Kleinhofs, 1996) (Fig.3). Los resultados muestran que hay una gran variación tanto en el contenido de GC de la tercera posición de los codones como en el número de intrones. La posición de los intrones está bastante conservada dentro de cada uno de los tres grupos, pero no entre ellos. La conservación en la posición de dos intrones entre los genes de NR de plantas superiores y algas indica que probablemente estos tengan un origen común. Los genes ancestrales de NR de plantas superiores y algas pudieron haber tenido todos los intrones y como consecuencia del proceso evolutivo hacia las plantas superiores la mayoría de los mismos se perdieron (Zhou y Kleinhofs, 1996).

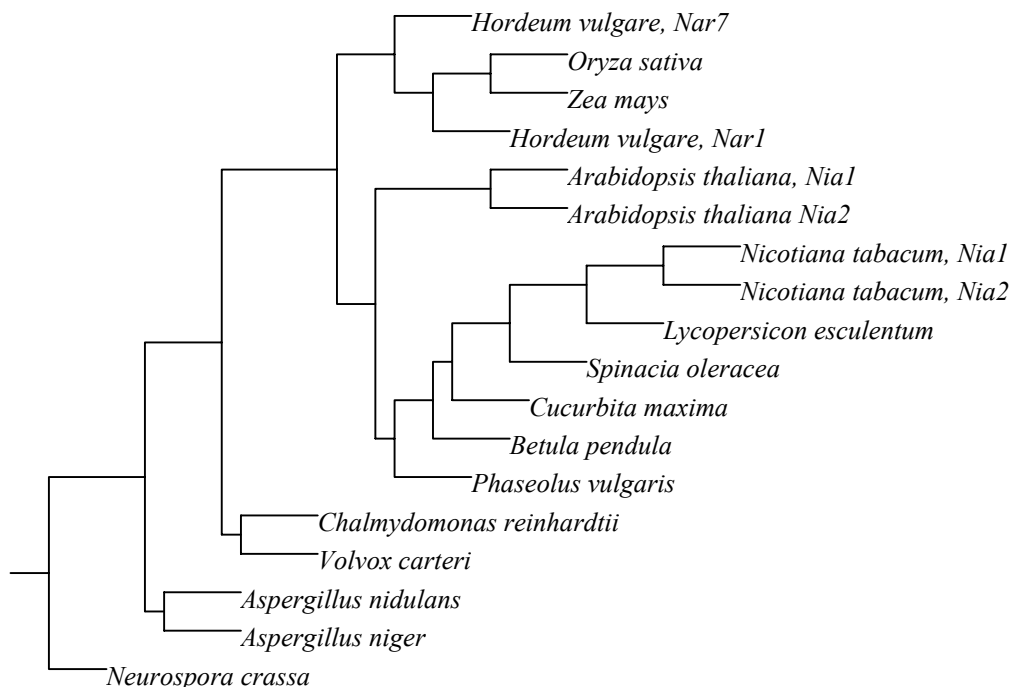


Fig. 3. Árbol filogenético según las comparaciones de secuencias de las NR de hongos, algas y plantas superiores (adaptado de Zhou y Kleinhofs, 1996).

Se acepta de modo general que la proteína NR tiene una localización citosólica en algas y plantas superiores, aunque existen datos contradictorios (Fischer y Klein, 1988; Hoff et al., 1994). Así, estudios inmunocitoquímicos han localizado la NR en el pirenoide de diferentes algas (López-Ruíz et al., 1985), en el cloroplasto en espinaca (Kleinhofs y Warner, 1990) y en el citoplasma en maíz (Vaughn y Campbell, 1988). En el contexto de regulación, la asociación de la NR a membrana tendría una importante relevancia fisiológica que estaría por demostrar. En este sentido, es de destacar que, en *Hansenula anomala*, una inactivación reversible de la nitrato reductasa por choque térmico, da lugar a la asociación de la enzima a membranas mitocondriales (Siverio et al., 1993) y en *Neurospora crassa*, la NR se asocia al plasmalema (Roldán et al., 1982).

Respecto a la localización supracelular de la actividad NR, en plantas como calabaza se restringe a tejidos fotosintéticos, por lo que el nitrato debe ser absorbido por la raíz y transportado hasta las hojas a través del xilema (Kleinhofs y Warner, 1990). En otras plantas como arroz y cebada se han descrito isoformas de la NR en hojas y raíz (Caboche y Rouzé, 1990).

### **Reducción de nitrito.**

En el último paso de la asimilación de nitrato, la nitrito reductasa (NiR) cataliza la transferencia de seis electrones para la reducción de nitrito hasta amonio. Se han descrito tres enzimas con actividad nitrito reductasa: 1. La NAD(P)H-nitrito reductasa (EC 1.6.6.4) presente en organismos quimioergónicos como *E. coli*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*; 2. la ferredoxina-nitrito reductasa (EC 1.7.7.1) restringida a organismos fotosintéticos (Guerrero et al., 1981) y que utiliza ferredoxina reducida como donador fisiológico de electrones, aunque también puede utilizar metil viológeno reducido en los ensayos *in vitro*; y 3. las sulfito reductasas asimiladoras y disimiladoras que posiblemente reducen el nitrito fortuitamente debido a una actividad residual del grupo sirohemo de la enzima (Kleinhofs y Warner, 1990). Se ha demostrado la existencia de sulfito reductasas en diversas especies de plantas como espinaca, guisante, trigo, maíz y cebada (Tamura et al., 1978; Von Arb, 1990; Duncanson et al., 1993).

La Fd-NiR se ha purificado hasta homogeneidad electroforética en una gran variedad de plantas (Vega et al., 1980; Wray y Fido, 1990) y algas como *Chlorella* (Zumft, 1972) y *C. reinhardtii* (Pajuelo et al., 1993). La NiR de plantas y algas es un monómero de aproximadamente 63 kDa. En hongos y bacterias, la NAD(P)H-NiR es un homodímero

compuesto por una cadena polipeptídica de 88-140 kDa (Cole, 1989). Todas las formas de NiR contienen como grupos prostéticos sirohemo y una agrupación sulfoférica [Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] que participan en la transferencia de electrones desde la ferredoxina reducida hasta el nitrito. En bacterias y hongos, la NiR presenta además FAD y quizás un centro sulfoférico no asociado al sirohemo (Crawford y Arst, 1993).

Las técnicas de detección en inmunotransferencias han revelado que los anticuerpos policlonales específicos anti-Fd-NiR o anti-Fd-GOGAT de *C. reinhardtii* dan reacción cruzada con ambas enzimas, la Fd-NiR y la Fd-GOGAT de este organismo. Así, se ha propuesto la existencia de determinantes antigénicos comunes localizados en el dominio de interacción con la ferredoxina (Romero et al., 1988; Pajuelo et al., 1993). Esta homología antigénica es extensible a enzimas de otras algas verdes (Gotor et al., 1990).

El gen de la NiR ha sido clonado y secuenciado en plantas tales como espinaca, maíz, abedul, arroz, *A. thaliana* y tabaco (Back et al., 1988; Lahners et al., 1988; Matsui et al., 1990; Labrie et al., 1991; Friemann et al., 1992; Vaucheret et al., 1992; Kronenberger et al., 1993), algas como *C. reinhardtii* (Quesada et al., 1998a), hongos como *A. nidulans* y bacterias como *E. coli* (Kinghorn y Campbell, 1989) y *Synechococcus* (Luque et al., 1993). Las secuencias de aminoácidos deducidas para la NiR de maíz y espinaca, donde el polipéptido es de 600 residuos (Back et al., 1988), muestran un elevado grado de identidad entre sí. De igual modo sucede al comparar las secuencias de bacterias (*E. coli* de 838 aminoácidos) y hongos (*A. nidulans* de 1104 aminoácidos) entre sí. No ocurre lo mismo cuando se comparan secuencias de plantas con bacterias u hongos (Campbell y Kinghorn, 1990). Sin embargo, las de plantas y cianobacterias presentan un alto grado de identidad (Luque et al., 1993; Merchán et al., 1995b).

En plantas se pueden distinguir especies con un gen de NiR por genoma haploide, como es el caso de espinaca (Back et al., 1988) ó dos copias como es el caso de maíz (Lahners et al., 1988) y tabaco que contiene cuatro genes, dos de cada ancestro. Los dos genes de NiR de tabaco procedentes de cada ancestro se expresan diferencialmente en hojas y raíces (Kronenberger et al., 1993).

En organismos eucariotas fotosintéticos, la NiR es una enzima cloroplástica codificada por un gen nuclear. La proteína debe ser importada al cloroplasto y madurada, por lo que su secuencia está precedida por un péptido señal. Este péptido señal ha sido identificado en diversas plantas como espinaca (de 32 aminoácidos) (Back et al., 1988) y abedul (de 22 aminoácidos) (Friemann et al., 1992), y presenta unas características típicas, al ser una secuencia rica en aminoácidos hidroxilados como serina y treonina. Así, en plantas la NiR en

hojas verdes se localiza en el cloroplasto (Dalling et al., 1972) y en tejidos no fotosintéticos como raíces, se encuentra localizada en los plastidios (Mifflin, 1974). Sin embargo, se ha propuesto la existencia de una forma de la NiR extracloroplástica en cotiledones de mostaza (Schuster y Mohr, 1990).

La estructura de la NiR es muy similar en cianobacterias, algas y plantas vasculares. La localización cloroplástica de la NiR de plantas sugiere una posible explicación de porqué la presión evolutiva no ha afectado a la estructura de estas NiR, al menos en la misma medida que a las NiR citosólicas y las de membranas (Quesada et al., 1998a).

### **Mutantes de asimilación de nitrato y regulación de la ruta.**

El aislamiento y caracterización de mutantes de la ruta de asimilación de nitrato es una herramienta poderosa no sólo para definir los elementos estructurales y reguladores de dicha ruta sino también para entender la función particular de cada uno de los componentes (Cove, 1976; Schoenmakers et al., 1991; Bisen y Shanthy, 1992; Vaucheret et al., 1992; Duncanson et al., 1993; Quesada et al., 1993).

El herbicida clorato se ha usado ampliamente para la obtención de mutantes afectados en la NR en bacterias, hongos, algas y plantas (Cove, 1976; Schoenmakers et al., 1991; Bisen y Shanthy, 1992; Prieto y Fernández, 1993). El mecanismo responsable de la toxicidad del clorato fue investigado por primera vez en plantas de trigo por Borje Aberg en 1947. Se observó que el clorato actuaba lentamente como compuesto tóxico, que no todas las células eran sensibles al clorato y que la toxicidad era incrementada por la luz. Se desarrolló la hipótesis de que el clorato al ser análogo del nitrato era sustrato de la NR (con una  $K_m$  del orden de 50-100 veces mayor respecto del nitrato) reduciéndose a clorito e hipoclorito que son los compuestos responsables de la toxicidad. Por tanto, el efecto tóxico del clorato estaría asociado a una NR funcional (Hoff et al., 1994). Sin embargo, y de manera generalizada, se han descrito mutantes resistentes a clorato que tienen actividad NR y mutantes carentes de nitrato reductasa que son sensibles a clorato (Cove, 1976; Nichols y Syrett, 1978; MacKown et al., 1996)

En el caso de *C. reinhardtii*, se ha demostrado que la toxicidad del clorato depende principalmente de la funcionalidad de los sistemas de transporte de nitrato/nitrito y que es independiente de una NR activa. El aislamiento de mutantes resistentes a clorato ha permitido identificar al menos 7 *loci* independientes responsables de dicha resistencia, y se propone

que estos *loci* participan de algún modo regulando y/o haciendo eficientes los transportadores de nitrato (Prieto y Fernández., 1993). De hecho, se han aislado mutantes resistentes a clorato (CR) que presentan deleciones o reorganizaciones en la agrupación génica de la NR (*Nia1*), y que están afectados en el transporte de nitrato (Quesada et al., 1993, Prieto y Fernández, 1993). También recientemente, se han aislado mutantes CR afectados en la expresión de *Nrt2;3* (Rexach et al., 1998). En resumen, se ha propuesto que en *C. reinhardtii*, el clorato entra por sistemas de transporte de nitrato/nitrito y una vez en el interior el clorato *per se*, o reducido a clorito por la NR, da cuenta de su toxicidad. La frecuencia con que se obtienen mutantes resistentes a clorato depende de la estirpe usada para mutagénesis, del medio de selección y de las concentraciones usadas para su selección (Fernández et al., 1998).

La utilización de  $^{36}\text{ClO}_3^-$ , como trazador radiactivo análogo del nitrato, ha demostrado que el clorato utiliza los sistemas de transporte de nitrato (Deane-Drummond, 1984; Guy et al., 1988; Wieneke, 1994). También se han aislado en plantas superiores mutantes resistentes a clorato afectados en los sistemas de transporte de baja afinidad (Doddema y Telkamp, 1979; Wallsgrove et al., 1989; Tsay et al., 1993) y alta afinidad (Wang y Crawford, 1996). De manera que cada vez es más aceptada la idea que la toxicidad del clorato se relaciona fundamentalmente con su transporte más que con su reducción (Prieto y Fernández, 1993; MacKown et al., 1996.)

La NR es una molibdoenzima, que para ser funcional necesita la unión del cofactor de molibdeno (MoCo) a la apoproteína. Los mutantes deficientes en el MoCo se pueden clasificar en dos grandes grupos: los de la clase I, capaces de sintetizar molibdopterina pero alterados en el metabolismo de Mo (consumo, procesamiento o incorporación a la molibdopterina). Estas mutaciones son reparables por altas concentraciones de molibdato en el medio. Los de la clase II, están afectados en algún paso de la biosíntesis de molibdopterina y no son reparables por molibdato. Se han identificado mutantes de MoCo en numerosos organismos bacterias, hongos, algas, plantas e incluso en humanos. En *E. coli* se han descrito 5 operones implicados en la síntesis del MoCo (Shanmugan et al., 1992). Los estudios realizados en *Neurospora crassa* han identificado mutaciones pertenecientes a la clase II en los genes *nit-1,7,8,9,A,B,C* (Dunn-Coleman, 1984). En *C. reinhardtii* se conocen al menos 5 genes (*Nit3,4,5,6,7*) relacionados con la ruta de biosíntesis del cofactor de molibdeno. Las mutaciones en los genes *Nit3*, *Nit7* están relacionadas con la biosíntesis de MoCo, siendo mutaciones de tipo II. Sin embargo las mutaciones en *Nit4*, *Nit5*, *Nit6* están relacionadas con el metabolismo del molibdato en la biosíntesis del MoCo, y pertenecen al tipo I. Las mutaciones *Nit5* y *Nit6* son crípticas, únicamente la doble mutación da lugar a un defecto en



el MoCo (Fernández y Matagne, 1984; Aguilar et al., 1992a,b). Estas mutaciones son recesivas, y no están ligadas genéticamente. Recientemente se ha caracterizado la mutación *Nit5* y se ha propuesto que NIT5 corresponde a un sistema de transporte de baja afinidad para molibdato (Llamas, 1997).

El gen *Nit2* de *C. reinhardtii* es el único gen regulador positivo de la ruta de asimilación de nitrato identificado hasta ahora en eucariotas fotosintéticos (Fernández y Matagne, 1986; Schnell y Lefebvre, 1993). Mutantes afectados en este *locus* no expresan NR, NiR ni los transportadores de nitrato/nitrito (Fernández y Cárdenas, 1982; Galván et al., 1992; Quesada et al., 1993). Este gen ha sido clonado mediante etiquetado con el transposón Gulliver de *C. reinhardtii* (Schnell y Lefebvre, 1993). Dicho gen da lugar a un transcrito de unas 6 Kb cuya expresión se regula negativamente por amonio. El hecho de que tanto los genes para la asimilación de nitrato como el propio *Nit2* se regulen negativamente por amonio sugiere que la represión metabólica negativa del amonio se realiza controlando los valores de NIT2 (Schell y Lefebvre, 1993).

Se han identificado otros dos posibles genes reguladores denominados *Nrg1* y *Nrg2* en *C. reinhardtii* mediante mutagénesis insercional (Prieto et al., 1996). Las mutaciones en estos *loci* son recesivas y no están ligadas. Dichos mutantes muestran un fenotipo de sensibilidad a clorato en presencia de amonio (CSA), como consecuencia de la expresión de la actividad de transporte de nitrato/nitrito en presencia de amonio. Aunque la función precisa de *Nrg1* y *Nrg2* se desconoce, se postula que podrían regular directa o indirectamente la actividad de los transportadores o participar en la señalización de las concentraciones intracelulares de metabolitos nitrogenados (Prieto et al., 1996). Recientemente, se han aislado otros mutantes insercionales afectados en la represión por amonio del gen *Nial* y se ha definido un nuevo *locus* *Far1* (Zang y Lefebvre, 1997). Dichos mutantes muestran un fenotipo similar a los *Nrg*.

La reducción de nitrato es un proceso que está sujeto a mecanismos de regulación muy precisos. La capacidad de reducir nitrato en hongos y organismos fotosintéticos varía según las condiciones ambientales de luz, temperatura, pH, fuente de carbono y nitrógeno disponibles, etc. Se han propuesto mecanismos de control que regulan, tanto transcripcional como postranscripcionalmente los TN, la NR y la NiR (Guerrero et al., 1981; Fernández et al., 1998).

El amonio, *per se*, o bien mediante su conversión en metabolitos derivados, tiene efectos claros a esos dos niveles. La adición de amonio da lugar a un bloqueo inmediato de la entrada de nitrato/nitrito a la célula (Florencio y Vega, 1982; Galván et al., 1996), la inactivación de la NR, y la represión de la síntesis de esta enzima (Morris y Syrett, 1963; Guerrero et al.,

1981; Franco et al., 1984). En *C. reinhardtii* la inactivación reversible de la NR ocurre por un proceso de interconversión redox (Herrera et al., 1972; Florencio y Vega, 1982). La forma inactiva de la NR parece actuar como señal para su degradación (Franco et al., 1987). En hojas de espinaca se ha descrito una inactivación por mecanismos de fosforilación y unión a proteínas 14-3-3 (McKintosh, 1992; Moorhead et al., 1996; Huber et al., 1996). Estos mecanismos de fosforilación parecen estar modulados *in vitro* por las cantidades de ATP/AMP (Kaiser y Spill, 1991) y están relacionados con la regulación de la NR por luz/oscuridad (Kaiser et al., 1992). De manera generalizada, también se ha descrito que la luz tiene un papel positivo regulando la expresión de genes relacionados con la asimilación de nitrato (Lanhers et al., 1988; Fernández et al., 1989; Melzer et al., 1989; Pouteau et al., 1989; Privalle et al., 1989; Faure et al., 1991; Quesada y Fernández, 1994). En el caso de *C. reinhardtii*, la presencia de acetato como fuente de carbono libera de la necesidad de señal positiva de la luz para la expresión de estos genes (Quesada y Fernández, 1994). Este mismo efecto se ha observado para la expresión de la NR en *Arabidopsis* por la presencia de glucosa (Crawford et al., 1986; Galangau et al., 1988; Privalle et al. 1989).

Tabla I. Nomenclatura y función de genes que participan en la asimilación de nitrato en *C. reinhardtii*. \* De acuerdo con la ISPMB.

Gen (nueva nomenclatura)*	Gen (antigua nomenclatura)	Producto proteico	Función
<i>Nia1</i>	<i>nit1</i>	NIA1 (NR)	Reducción de nitrato
<i>Nit3, Nit7</i>	<i>nit3, nit7</i>	NIT3, NIT7	Biosíntesis de MoCo
<i>Nit4, Nit5, Nit6</i>	<i>nit4, nit5, nit6</i>	NIT4, NIT5, NIT6	Metabolismo del $\text{MoO}_4^{2-}$ en biosíntesis del MoCo
<i>Nar2</i>	<i>nar-2</i>	NAR2	Componente del Sistema I y II
<i>Nrt2;1</i>	<i>nar-3</i>	NRT2;1	Componente del Sistema I
<i>Nrt2;2</i>	<i>nar-4</i>	NRT2;2	Componente del Sistema II
<i>Nrt2;3</i>	-	NRT2;3	Posible componente de NiT de alta afinidad
<i>Nii1</i>	-	NIII (NiR)	Reducción de nitrito
<i>Nit2</i>	<i>nit2</i>	NIT2	Factor regulador positivo
<i>Nrg1, Nrg2</i>		NRG1, NRG2	Factores reguladores negativos

La luz actúa de forma directa al ser usada como fuente de energía en la fotosíntesis, e indirectamente como una señal reguladora en la expresión de los genes para la NR, NiR y TN. Los mecanismos precisos de cómo la luz regula la asimilación de nitrato no se conocen con precisión. En términos generales, los fenómenos de fotoaclimatación requieren que el organismo sienta las diferencias en la intensidad de la luz, convirtiendo esta señal en información bioquímica que es transferida a elementos reguladores responsables de la expresión de los genes. La luz se percibe por fotoreceptores (fitocromo, UV-A, UV-B) generándose cascadas de transducción de señales que dan lugar en último lugar a la expresión de genes que están bajo control de la luz (Bowler et al., 1994; Short, 1994; Terzaghi y Cashmore, 1995). En el caso de *Dunaliella tertiolecta* se ha propuesto un modelo de cómo la intensidad de la luz es percibida por el aparato fotosintético y cómo la cadena de transporte de electrones acoplada a la fotosíntesis modifica la expresión de genes nucleares (Escoubas et al., 1995). En este modelo, el estado redox de las plastoquinonas regula la actividad de proteínas quinasas que en último lugar fosforilan un factor represor de *cab* (Escoubas et al., 1995). También se ha demostrado en tabaco, que la abundancia de mRNA de ferredoxina unido a los polisomas se regulan por cambios en intensidad de luz. De manera que en la luz, pero no en la oscuridad, aumenta la concentración de mRNA de ferredoxina unido a polisomas.

Las xantofilas es un grupo de carotenoides oxigenados que en un gran número de eucariotas fotosintéticos están unidas en su mayoría a clorofilas y complejos de recolección de luz. Las proteínas *cab* absorben y transfieren energía excitada, convirtiendo la energía de la luz en energía química usada para fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico en azúcares. Las xantofilas protegen a los organismos fotosintéticos de los efectos tóxicos de la luz (Niyögi et al., 1997). Sin embargo, la contribución que juega la luz en la expresión de la NR está aún por determinar. La comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la luz y el metabolismo de carbohidratos es esencial para conocer los factores que regulan la transcripción de la NR. Se han aislado mutantes afectados en la regulación por luz en la expresión de la NR en *Arabidopsis*. Esta mutación no afecta específicamente a la NR, ya que otros genes regulados por luz como *Cab* y *Rbcs* también están afectados (Lin y Cheng, 1997). El aislamiento de mutantes afectados en la regulación por luz y en la asimilación de nitrato demuestra que la asimilación de nitrato está acoplada a la fotosíntesis.

La actividad de canales iónicos parecen participar en el inicio y transducción de señales en plantas superiores (Ward et al., 1995). En este sentido es interesante señalar estudios realizados en *Arabidopsis* que indican la presencia en membrana plasmática de canales

aniónicos regulados por luz azul, que se bloquean por el inhibidor de canales de cloruro (NPPB) (Cho y Spalding, 1996).

En el alga verde *Monoraphidium braunii*, la luz azul activa los sistemas de transporte de aniones monovalentes tales como,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  (Aparicio y Quiñones, 1991; Aparicio et al., 1994; Quiñones et al., 1997). La afinidad por el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  es similar, inhibiendo competitivamente el cloruro la entrada de nitrato al interior celular (Witt y Aparicio, 1995a). La incorporación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  posiblemente se lleve a cabo a través del mismo sistema de transporte, aunque en el caso del transporte de nitrato se ha postulado la existencia de un componente adicional a pH 8,0 que da lugar a un aumento en el retraso de la transducción luminosa (Witt y Aparicio, 1995a; Aparicio et al., 1994). Los espectros de acción de la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  son similares, lo que indica que el mismo fotoreceptor podría activar el transporte de ambos aniones, pudiendo estar localizado en la membrana plasmática dada su rápida respuesta (Witt y Aparicio, 1995b). Se ha formulado la hipótesis de que dicho fotoreceptor sea una NR ligada a la membrana plasmática. Se tiene conocimiento, en *Chlorella sorokiniana* y en células de plántulas de cebada, de la existencia de una NR ligada a la cara externa de la membrana plasmática, sugiriendo una relación directa con el transporte de nitrato (Ward et al., 1988; Tischner et al., 1989). Sin embargo, los estudios realizados en *Chlorella saccharophila* sugieren que la función de dicha NR está asociada a la recepción de luz azul que estimularía la incorporación de nitrato (Stöhr et al., 1995).

La expresión de genes para la asimilación de nitrato (NR y NiR) bajo control de promotores constitutivos ha sido muy útil para determinar la regulación de estos genes transcripcional y post-transcripcional por nitrato, amonio y ciclos de luz oscuridad. Los estudios realizados en plantas transgénicas que expresan constitutivamente el gen de NR (*Nia1*) bajo el control del promotor *CaMV*-35S indican que hay una regulación importante por nitrato transcripcionalmente (Vincentz y Caboche, 1991; Hoff et al., 1994). Sin embargo, el hecho de que la cantidad de proteína NR descienda significativamente al ser transferidas a oscuridad las plantas que la expresan constitutivamente, indica que la regulación de la NR por la luz es post-transcripcional. Dicha regulación por la luz desaparece en plantas transgénicas que expresan una NR deletada en la región amino terminal (Nussaume et al., 1995). Las secuencias 5' o 3' no traducidas del mensajero de la NR pueden estar también relacionadas en regulación traducional (Vincentz y Caboche., 1991). En cambio en el caso de la NiR, el nitrato parece jugar un papel esencial postranscripcionalmente (Creté et al., 1997).

La expresión constitutiva del gen *Nia1* de *Nicotiana* da lugar a un fenotipo de sensibilidad a clorato en presencia de amonio (CSA), y es una característica fenotípica que puede utilizarse como marcador seleccionable de plantas transgénicas que expresen el gen *Nia1* bajo el promotor 35S mostrando altos valores de actividad NR. La eficiencia de este método depende de la cantidad de actividad NR conferida por la construcción 35S- *Nia1* a las plantas transgénicas, teniendo como limitación la alta frecuencia de obtención de mutantes de NR afectados en genes involucrados en la biosíntesis del cofactor de Molibdeno *cnx* que se discriminan fácilmente por la pérdida de función (Nussaume et al., 1991).

Análogamente en *C. reinhardtii* se ha expresado constitutivamente el gen *Nia1* bajo el control del promotor del gen *CabII-1* que codifica para una proteína de unión de clorofila a/b del fotosistema II (Imbault et al., 1988). Dicha construcción se ha introducido por transformación en estirpes *NiaI<sup>-</sup>*. Los transformantes son capaces de crecer en medios con nitrato, expresan elevadas cantidades de mRNA de NR en medios con amonio, aunque la actividad NR es indetectable (Blankenship y Kindle, 1992). Estudios posteriores, revelaron que la NR expresada bajo control del promotor *Cab*, en medios con amonio, estaba en una forma inactiva; siendo reactivable *in vitro* por ferricianuro, o *in vivo* por nitrato. Estos resultados llevaron a concluir que la presencia de una NR constitutiva, en *C. reinhardtii*, debía de desregular de alguna manera la expresión/actividad de los transportadores de nitrato/nitrito permitiendo su expresión en medios con amonio, lo que explicaría el fenotipo de sensibilidad a clorato en presencia de amonio y la reactivación por nitrato en medios con amonio (Prieto, 1993).

El análisis de la regulación de las actividades reductoras de nitrato y nitrito en mutantes afectados tanto en el gen estructural de la NR como en los genes implicados en la síntesis del MoCo de hongos, algas y plantas, han llevado a desarrollar dos hipótesis que explican el comportamiento desregulado en la expresión de la cantidad de transcrito, proteína y actividades enzimáticas.

En plantas, hongos y algas, los mutantes en el gen estructural de la NR o en la biosíntesis del cofactor de molibdeno sobreexpresan los transcritos de NR, NiR y TN (Kleinhofs et al., 1989; Pouteau et al., 1989; Faure et al., 1991; Wilkinson y Crawford, 1991; Labrie et al., 1992; Kronenberger et al., 1993; Quesada y Fernández, 1994), sin necesidad de una señal positiva de nitrato. Estos resultados indican que la actividad NR de alguna forma tiene un papel, regulando la expresión de genes para la asimilación de nitrato.

En el caso de plantas superiores, parece ser que es la ausencia de metabolitos derivados de la reducción de nitrato la responsable de estos efectos, ya que los mutantes de NiR muestran el mismo patrón de desregulación (Vaucheret et al., 1992; Duncanson et al., 1993).

En hongos y algas, parece que la NR si tiene un papel regulador, aunque el mecanismo preciso se desconoce. En *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Cove, 1979; Fu y Marzluf, 1988; Unkles et al., 1991; Hawker et al., 1992) se ha demostrado que los mutantes de NR expresan constitutivamente los mRNA de NR, NiR y TN, mientras que las mutaciones en los genes de NiR y TN no tienen este efecto. Análogamente, en *C. reinhardtii* el efecto de una NR inactiva, tanto en los mutantes del gen estructural de la NR como en los de la biosíntesis del cofactor de molibdeno (o en una estirpe silvestre tratada con tungsteno), resulta en la sobreexpresión de la NR y TN (Quesada y Fernández, 1994), así como en altos valores de actividad NR y NiR (Fernández y Cárdenas, 1989; Galván et al., 1992).

**Los objetivos del presente trabajo han sido:**

1. La obtención y caracterización de mutantes del alga verde *C. reinhardtii* afectados en el paso de reducción de nitrito y en la ruta de asimilación de nitrato, para aclarar puntos de regulación que controlan dicha ruta.
2. La construcción de vectores de expresión que permitan la complementación de mutaciones precisas de la ruta de asimilación de nitrato con genes heterólogos de plantas.
3. El estudio de estirpes de *C. reinhardtii* que expresan la NR constitutivamente, con el objeto de comprender el posible papel regulador de esta enzima.

Parte de estos resultados han sido publicados en:

### Revistas

Navarro MT, Prieto R, Fernández E, Galván A (1996) Constitutive expression of nitrate reductase changes the regulation of nitrate and nitrite transporters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **9**, 819-827

### Capítulo de libro

Navarro MT, Fernández E, Pajuelo E, Galván A (1997) Regulación de la asimilación de nitrato en mutantes deficientes en el gen *Nii1* (nitrito reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii*. *Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular; IV Reunión Nacional, Marbella. 1997* (Vega JM, Aparicio PJ, Castillo F, Maldonado JM, eds), pp 295-299. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

### Comunicaciones a Congresos

1. Navarro MT, Galván , Fernández E. Construction of nitrite reductase mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* // Vth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry. Salamanca. España. Septiembre, 1994
2. Navarro MT, Prieto R, Fernández E, Galván A. Nitrate reductase. Constitutive expression of nitrate reductase deregulates the expression of nitrate transport activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. Euroconference on the Experimental Biology of *Chlamydomonas*. Amsterdam, Holanda. Mayo, 1995
3. Navarro MT, Prieto R, Fernández E, Galván A. La expresión de la nitrato reductasa bajo control del promotor CAB-II desregula la actividad de los sistemas de transporte de nitrato en *C. reinhardtii*. Córdoba. Septiembre, 1995
4. Navarro MT, Prieto R, Quesada A, Fernández E, Galván A. Señales moleculares en la regulación de la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*. IV Congreso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal. XI Reunión Nacional de la S.E.F.V. Estoril, Portugal. Octubre, 1995

5. Navarro MT, Fernández E, Galván A. Nitrate reductase is a key regulatory element in the expression and activity of nitrate transporters. 7th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Regensburg, Alemania. Mayo, 1996
6. Navarro MT, Fernández E, Pajuelo E, Galván A. Regulación de la asimilación de nitrato en mutantes deficientes en el gen *Nii1* (Nitrito reductasa) de *Chlamydomonas reinhardtii*. IV Reunión Nacional de Metabolismo del Nitrógeno, Marbella, Málaga. Febrero, 1997
7. Fernández E, Galván A, Quesada A, Navarro MT, Rexach J, Dubus A, Prieto R, Macías M. Molecular studies on nitrate assimilation in *Chlamydomonas* as a model system for higher plants. Phytosfere '97, Dublin. Abril, 1997
8. Fernández E, Galván A, Quesada A, Prieto R, Dubus A, Navarro AT, Rexach J, Pozuelo M, Gomez I. The nitrate transport systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. NAMGA 97 Nitrogen assimilation: Molecular and Genetic Aspects, University of South Florida, U.S.A. Mayo, 1997
9. Navarro MT, Galván A, Fernández E. Nitrate reductase regulates nitrate transport activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. 5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation. Luso, Portugal. Julio, 1998



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Organismos empleados. Medios y condiciones de cultivo.

### 1.1 Estirpes bacterianas.

Tabla II. Estirpes de *E. coli* utilizadas

Estirpe	Genotipo
DH5 $\alpha$ F'	F' $\phi$ 80d <u>lacZ</u> AM15 <u>A</u> lacU169 <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>hsdR17</u> <u>supE44</u> <u>thi-1</u> <u>gyrA96</u> <u>relA1</u>
XL1-blue	$\Delta$ ( <u>mcra</u> )183 $\Delta$ ( <u>mercb-hsdSMR-mrr</u> )173 <u>endA1</u> <u>supE44</u> <u>thi-1</u> <u>reacA1</u> <u>gyrA96</u> <u>relA1</u> lac [F' proAB <u>lacI<sup>q</sup>Z</u> $\Delta$ M15 tn10 ( <u>tet<sup>r</sup></u> )]

#### 1.1.1 Medios de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli*, empleadas en este trabajo para la subclonación de fragmentos de DNA, se cultivaron en medio de cultivo LB (Sambrook et al., 1989):

- 10 g/l Bactotripton
- 5 g/l Extracto de levaduras
- 5 g/l NaCl
- Bacto-agar al 1,6% (en medios sólidos)

#### 1.1.2 Condiciones de cultivo.

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado a 37°C con agitación (150-250 r.p.m.). Se emplearon tubos de ensayo o erlenmeyer dependiendo del volumen de células a obtener, manteniendo en cualquier caso una relación de volumen líquido/volumen vacío de 1:4 para una buena aireación del cultivo y un crecimiento óptimo.

El material empleado, medios y tubos o erlenmeyers, fueron previamente esterilizados en autoclave. Los antibióticos u otros compuestos como glucosa, añadidos tanto a medios sólidos como líquidos previamente estériles, fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro, teniendo en cuenta que la temperatura del cultivo no fuera superior a 50°C.

Los cultivos de células que contenían plásmidos con el gen de resistencia al antibiótico ampicilina, fueron suplementados con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. De igual modo, para el análisis de selección de colonias recombinantes en función del marcador  $\beta$ -

galactosidasa, se utilizaron placas de medio LB sólido suplementado con X-Gal (0,8 mg/l), IPTG (0,8  $\mu$ g/l) y ampicilina 100  $\mu$ g/ml.

## 1.2 Estirpes de hongos.

La estirpe nit-1-54 de *Neurospora crassa* fue empleada para los ensayos de complementación *in vitro* en la determinación del MoCo de las estirpes de *C. reinhardtii*.

Para la conservación de la estirpe, las esporas se mantuvieron en la oscuridad, a una temperatura entre 5 y 10°C. Para obtener micelios, las esporas se sembraron en medio sólido estéril con amonio. A los 4-5 días aparecían los micelios que se mantuvieron a temperatura ambiente. El proceso de renovación se repitió cada cinco meses.

### 1.2.1 Medio de cultivo.

Los micelios del mutante nit-1-54 de *Neurospora crassa* proceden del Fungal Genetics Stock Center en Arcata, California, U.S.A. El medio de cultivo utilizado fue el basal de Fries (Garret, 1972), en condiciones previamente establecidas (Fernández y Cárdenas, 1981) cuyo contenido por litro es:

- Sacarosa 20 g
- Tartrato sódico potásico 2,5 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,14 g
- NaCl 0,1 g
- Biotina 5  $\mu$ g
- Trazas de Fries 1 ml
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (75 mM) 4 g

La Biotina se añadió al medio autoclavado. El medio sólido contenía además Bacto-agar Difco al 1,75%.

La disolución de trazas de Fries contiene por litro:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8,8 g;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,96g;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,34 g;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0,088 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,072 g; y  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,64 g.

### 1.2.2 Condiciones de cultivo.

Los micelios del hongo se cultivaron en aerobiosis, en un agitador orbital a 27°C en oscuridad. Después de dos/tres días de cultivo se recogieron por filtración a través de una gasa, lavándose varias veces con agua desionizada. Se transfirieron a un medio fresco con nitrato potásico 20 mM como única fuente de nitrógeno, durante 3 horas para inducir la síntesis de aponitrato reductasa (se observa un cambio de color de blanco a rosado). Pasado este tiempo, los micelios se lavaron y se congelaron a -80°C hasta su uso.

### 1.3 Estirpes de *C. reinhardtii*.

Tabla III. Estirpes de *C. reinhardtii* utilizadas.

Las abreviaturas del fenotipo son: ac<sup>-</sup>, requerimiento de acetato; str<sup>R</sup>, resistente a estreptomycin; Nit<sup>+</sup>, crecimiento en nitrato; Nit<sup>-</sup>, no crecimiento en nitrato; Niit<sup>-</sup>, no crecimiento en nitrito; cw<sup>-</sup>, carente de pared celular; CRA, resistencia a clorato en presencia de amonio; CSA, sensibilidad a clorato en presencia de amonio.

Referencias:

1. Aguilar et al., 1992a; 2. Blankeship y Kindle, 1992; 3. Fernández y Matagne, 1984; 4. Harris, 1989; 5. Quesada et al., 1993; 6. Quesada et al., 1994; 7. Prieto, 1993; 8. Sosa et al., 1978; 9. Este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Ref.
6145c	mt <sup>-</sup>	Nit <sup>+</sup>	3, 4, 8
21gr	mt <sup>+</sup> <i>Nit5</i>	Nit <sup>+</sup>	3, 4, 8
305	mt <sup>-</sup> <i>Nia1</i>	Nit <sup>-</sup>	3, 4, 8
305cw15	mt <sup>+</sup> <i>Nia1</i> cw15	Nit <sup>-</sup> cw <sup>-</sup>	4
104d	mt <sup>-</sup> <i>Nit4</i>	Nit <sup>-</sup>	4
102d	mt <sup>-</sup> <i>Nit5, Nit6</i>	Nit <sup>-</sup>	4
307d	mt <sup>-</sup> <i>Nit3</i>	Nit <sup>-</sup>	4
H1d	mt <sup>-</sup> <i>Nit7</i>	Nit <sup>-</sup>	1
G1	mt <sup>-</sup> ac-17 sr-1 $\Delta$ <i>Nii1</i> $\Delta$ ( <i>Nar1, Nar2, Nrt2;1, Nrt2;2</i> )	Nit <sup>-</sup> ac <sup>-</sup> str <sup>R</sup> /Nii-	5
04-1	mt <sup>+</sup> :: <i>Nia1, Nrt2;1, Nrt2;2, Nar2</i>	Nit <sup>+</sup>	9
M1	$\Delta$ <i>Nii1</i> :: <i>Nia1, Nrt2;1, Nrt2;2, Nar2</i>	Nit <sup>-</sup> /Niit <sup>-</sup>	9
M2	$\Delta$ <i>Nii1</i> :: <i>Nia1, Nrt2;1, Nrt2;2, Nar2</i>	Nit <sup>-</sup> /Niit <sup>-</sup>	9
M3	$\Delta$ <i>Nii1</i> :: <i>Nia1, Nrt2;1, Nrt2;2, Nar2</i>	Nit <sup>-</sup> /Niit <sup>-</sup>	9
M4	$\Delta$ <i>Nii1</i> $\Delta$ ( <i>nar1, nar2, Nrt2;1, Nrt2;2</i> )	Nit <sup>-</sup> /Niit <sup>-</sup>	9
P4	$\Delta$ <i>Nia1</i>	Nit <sup>-</sup>	9
S10	mt <sup>+</sup> $\Delta$ ( <i>Nar1, Nar2, Nrt2;1, Nrt2;2</i> )	Nit <sup>-</sup>	6
Tx11-8	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>+</sup> cw <sup>-</sup> CSA	2, 7, 9
R-(1 y 2) Tx11-8	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>-</sup> cw <sup>-</sup> CRA	9
15c <sup>-</sup> , 20c <sup>-</sup> , 1b <sup>-</sup> , 13b <sup>-</sup> , 17b <sup>-</sup> , 4c <sup>-</sup>	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>-</sup> CRA	9
23c <sup>+</sup>	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>+</sup> CRA	9
6b <sup>+</sup> , 50b <sup>+</sup> , 48b <sup>+</sup> , 16b <sup>+</sup> , 27b <sup>+</sup>	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>+</sup> CRA	9
3b <sup>+</sup> , 5b <sup>+</sup> , 1c <sup>+</sup> , 12a <sup>+</sup>	mt <sup>+</sup> :: <i>pCabII-1 Nia1</i>	Nit <sup>+</sup> CRA	9
NRcG1(2, 9, 12, 17)	$\Delta$ <i>Nii1</i> :: <i>pCabII-1 Nia1</i> $\Delta$ ( <i>Nar1, Nar2, Nrt2;1, Nrt2;2</i> )	Nit <sup>-</sup> CSA	9
NRcG1 - 2R1, 9R(1,2), 12R(1,2,3)	$\Delta$ <i>Nii1</i> :: <i>pCabII-1 Nia1</i> $\Delta$ ( <i>Nar1, Nar2, Nrt2;1, Nrt2;2</i> )	Nit <sup>-</sup> CRA	9

### 1.3.1 Medios de cultivo.

Los medios utilizados para el cultivo de *C. reinhardtii* fueron preparados a partir de las siguientes soluciones concentradas (Harris, 1989):

- Solución Tris: 121 g/l Trizma base
- Solución A:
  - 5 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - 10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
  - 40 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Solución A-N: Igual que la solución A pero sin  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Solución B:
  - 115 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
  - 46 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Solución de oligoelementos (Hutner et al., 1950): 10 g de EDTA (ácido libre) se disolvieron en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . A continuación se calentaron 550 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $100^\circ\text{C}$  y se añadieron, por el siguiente orden los siguientes compuestos: 11,4 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 22 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,1 g/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,6 g/l  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 1,6 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,214 g/l  $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Tras mezclar ambas soluciones se calienta la mezcla a  $100^\circ\text{C}$ , se deja enfriar hasta  $80\text{-}90^\circ\text{C}$ , y se ajusta el pH a 6,8, usando KOH al 20% procurando que la temperatura no baje de  $70^\circ\text{C}$ . Tras llevar el volumen hasta 1 l, se mantiene en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 días antes de su uso.

Preparación de los medios:

- Medio TAP:
  - 20 ml/l de Tris 1M
  - 10 ml/l Solución A ó A-N (medios TAP-N)
  - 0,95 ml/l ácido acético glacial
  - 1 ml/l Solución B
  - 1 ml/l Solución de oligoelementos
- Medio mínimo:
  - 10 ml/l Solución B
  - 10 ml/l Solución A ó A-N (medios -N)
  - 1 ml/l Solución de oligoelementos

En la preparación de medios con otra fuente de nitrógeno distinta a  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se utilizó la solución A-N suplementada con la concentración adecuada de dicha fuente.

Para la preparación de medios sólidos, los medios fueron suplementados con agar Difco al 1,5-1,6% peso/volumen, a excepción de los utilizados en la maduración de zigotos en los cruces genéticos, en los que la concentración utilizada fue de 4%. Estos medios sólidos fueron vertidos en placas *petri* cuando la temperatura del medio era de 50°C aproximadamente. En la preparación de medios con clorato, éste fue filtrado y posteriormente se añadió al medio ya estéril.

### **1.3.2 Condiciones de cultivo.**

#### **1.3.2.1. Cultivos con luz continua.**

Las células se cultivaron en medios con amonio en una cámara termostatzada a 25°C con iluminación continua de 15-20  $\text{W/m}^2$  proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca. Los medios líquidos de cultivo se burbujearon con aire enriquecido al 3-5% v/v con  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. Como recipientes de estos medios líquidos se utilizaron frascos de *Roux* o tubos de 250 ml, en función del volumen celular que se necesitase obtener.

Las células se recogieron por centrifugación, en fase exponencial de crecimiento, a 3500-4000 r.p.m. durante 2-3 min, se lavaron con agua desionizada o medio mínimo sin nitrógeno y se transfirieron a medios que contenían la fuente de nitrógeno deseada.

#### **1.3.2.2. Cultivos sincronizados (luz/oscuridad).**

Células cultivadas como se describe previamente, se transfirieron a medios con diferentes fuentes de nitrógeno y fueron sometidas a ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h en un fitotrom (Growth cabinet, Sanyo), manteniéndose la misma intensidad de luz durante los ciclos de luz y gaseándose en todo momento con 3-5% de  $\text{CO}_2$ .

## **2. Determinación de actividades enzimáticas.**

### **2.1 Actividad NAD(P)H–Nitrato reductasa.**

La actividad NAD(P)H-NR se determinó a partir del nitrito aparecido en el medio por reducción enzimática del nitrato, y utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Paneque y Losada, 1966). La actividad se determinó *in situ*, en suspensiones de células permeabilizadas con 500 U/ml de nistatina (Fernández y Matagne, 1986), o *in vitro* en

extractos crudos obtenido por congelación/descongelación (Fernández y Cárdenas, 1982) donde la pella celular se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

La reacción *in situ* se desarrolló en un volumen total de 1,4 ml que contenía: 1 ml de células permeabilizadas, 100  $\mu$ moles de Tris-HCl, pH 7,5, 10  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_3$  y 0,3  $\mu$ moles de NAD(P)H. La reacción *in vitro* se realizó en un volumen total de 0,25 ml que contenía: 0.1 ml de extracto, 25  $\mu$ moles de Tris-HCl, pH 7,5, 2,5  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_3$  y 0,075  $\mu$ moles de NAD(P)H. En ambos casos, la reacción se inició con el NAD(P)H y tuvo lugar a 30°C durante 30 min. El nitrito producido se valoró por el método de Snell y Snell, 1949.

## 2.2 Actividad BVH-Nitrato reductasa.

La actividad BVH-NR se llevó a cabo determinando colorimétricamente el nitrito aparecido en el medio de reacción y se llevó a cabo en células permeabilizadas con 20  $\mu$ l/ml de tolueno (Florencio y Vega, 1983). Se utilizó bencil viológeno, reducido químicamente por acción de ditionito sódico, como donador artificial de electrones (Paneque et al., 1965). La reducción de nitrato se desarrolló en un medio de reacción que contenía en un volumen total de 1,4 ml: 100  $\mu$ moles de Tris-HCl, pH 7,5, 10  $\mu$ moles de nitrato potásico, 2  $\mu$ moles de BV y 1 ml de células permeabilizadas. La reacción se inició tras la adición de 5,7  $\mu$ moles de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  disuelto en 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, a 30°C durante 10 min. La reacción se paró por oxidación del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  al agitar fuertemente los tubos donde se está desarrollando la reducción con el vortex. Cada muestra se hizo por duplicado, parando un ensayo (blanco) a tiempo cero de la reacción.

También se determinó la actividad BVH-NR *in vitro*, a partir de extractos celulares. Para ello se redujo el volumen de la mezcla de reacción a 0,25 ml, la cual contenía: 100  $\mu$ l de extracto, 25  $\mu$ moles de Tris-HCl, pH 7,5, 2,5  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_3$ , 0,5  $\mu$ moles de BV y 1,4  $\mu$ moles de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ .

## 2.3 Actividad MVH-NiR.

La actividad NiR se midió colorimétricamente por desaparición de nitrito del medio de reacción, utilizando como donador artificial de electrones metil viológeno reducido químicamente por  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Paneque et al., 1965). La reacción se llevó a cabo *in situ*, con células permeabilizadas con tolueno e *in vitro*, en extractos celulares.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ l de extracto celular o 100  $\mu$ l de una suspensión de células permeabilizadas, 150  $\mu$ moles de Tris-HCl, pH 8,0, 0,4  $\mu$ moles de  $\text{KNO}_2$  y 0,8  $\mu$ moles de MV. La reacción se inició por adición de 8,6  $\mu$ moles de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  disuelto en  $\text{NaHCO}_3$  0,29 M. La reacción se detuvo por oxidación del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , agitando fuertemente en vortex, a tiempo cero (blanco) y tras 10 min de incubación a 37°C. La determinación de nitrito se hizo en alícuotas de 0,1 ml de estos medios.

## 2.4 Actividad MoCo

La determinación del cofactor de Molibdeno (MoCo) en estirpes de *C. reinhardtii* se llevó a cabo mediante ensayos de complementación con extractos de un mutante *nit-1* de *Neurospora crassa*, que carece de MoCo y por tanto posee una aponitrato reductasa no funcional.

En los extractos crudos de *C. reinhardtii* cultivadas en amonio, el MoCo se encuentra en diferentes formas: I) como una especie libre de bajo peso molecular, II) unido a una proteína de aproximadamente 50 kDa portadora de MoCo (MoCoCP), que puede liberarlo reconstituyendo *in vitro* la actividad NR del mutante *nit-1* de *Neurospora crassa* y III) unido a proteínas, posiblemente molibdoenzimas constitutivas, que únicamente liberan MoCo tras un tratamiento desnaturalizante (Aguilar, 1991).

MoCoCP puede donar directamente MoCo a la aponitrato reductasa sin tratamiento térmico previo, el cual es necesario para liberar el MoCo unido a las enzimas (Aguilar et al., 1992b).

### 2.4.1 Tampones empleados en el ensayo *nit-1*.

- Solución A: 6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 19 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5; 25 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y 5 mM EDTA. La solución se desgaseó y se agregó 1 mM DTT; 2 mM de ácido ascórbico; 0,1 mM PMSF y 10  $\mu$ M de PMS.
- Solución B: 77,3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 122,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2; 60 mM  $\text{KNO}_3$  y 5 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .
- Tampón de extracción: 50 mM de tampón fosfato, pH 7,2; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 5 mM EDTA y 0,1 mM PMSF.



#### 2.4.2 Extractos de *nit-1* de *Nerospora crassa*.

Los extractos se prepararon por congelación/descongelación en nitrógeno líquido de los micelios de *nit-1* que se rompieron en un mortero con arena, al que se añadió el tampón de extracción en una relación 1:5 p/v, previamente desgaseado y saturado con nitrógeno. El homogeneizado resultante se centrifugó a 20000 g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se congeló en nitrógeno líquido en alícuotas, almacenándolas a -80°C hasta su uso.

En el momento de realizar el ensayo de complementación se añadió 25 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 μM PMSF y 2 mM de ascorbato.

#### 2.4.3 Extractos de *C. reinhardtii*.

Las pellas celulares se congelaron a -20°C, siendo posteriormente resuspendidas en una relación 1:2 (p/v) en solución A, previamente desgaseada y saturada en nitrógeno. El extracto se centrifugó a 17500 x g durante 10 min, previamente a su uso.

#### 2.4.4 Ensayo de actividad MoCo.

La complementación *in vitro* entre el extracto celular de *C. reinhardtii* y el extracto *nit-1* de *Nerospora crassa* se desarrolló a 15°C durante 1 h en condiciones anaerobias, en una relación 1:10 o 1:100. Esta relación es para conseguir que el ensayo sea cuantitativo y no se produzca limitación de la aponitrato reductasa de *nit-1* por parte del MoCo extraído.

Una vez finalizado el ensayo de complementación, se midió la actividad NAD(P)H-NR reconstituida del mutante *nit-1* de *Neurospora crassa*. A la mezcla de complementación se le añadió solución B en relación 1:1, 0,7 mM de NAD(P)H y 20 μM de FAD. La reacción se desarrolló a 25°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 min y 1 h, en función de la actividad resultante en los extractos de las diferentes estirpes. Finalizada la reacción, se le añadieron volúmenes iguales de reactivo SULFA y NNEDA para valorar el nitrito. Cuando se utilizaron extractos de cultivos de células inducidos en nitrato, se hicieron controles para comprobar si la actividad resultante era producto de la complementación. Una unidad de MoCo activo se define como la cantidad de MoCo que da lugar a una unidad de NR reconstituida, expresada como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μmol de nitrato por minuto.

## **2.5 Actividad de consumo de nitrato y nitrito.**

La actividad de consumo de nitrato y nitrito se determinó por medida de la desaparición de nitrato o nitrito del medio a lo largo del tiempo, en medios que contenían 0,1 mM de  $\text{KNO}_3$  o  $\text{KNO}_2$ , y una concentración de células de aproximadamente 20-35  $\mu\text{g/ml}$  de clorofila.

### **2.5.1 Actividad de consumo de nitrato.**

La actividad de consumo de nitrato se determinó midiendo la concentración de nitrato, a 210 nm por HPLC, en el medio libre de células (Quesada et al., 1993). Se utilizó una columna de intercambio iónico Nucleosil 100-10SB de 10  $\mu\text{m}$  (250 x 4 mm) y como tampón de elución fosfato 127 mM, pH 4,0, a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

Preparación de reactivos:

- -Tampón fosfato 127 mM, pH 4,0: Solución preparada en agua bidestilada que contiene ácido fosfórico (8,3 ml/l) y NaOH (4,5 g/l). Previamente a su uso el tampón se filtró y desgaseó.

### **2.5.2 Actividad de consumo de nitrito.**

Para la valoración del consumo de nitrito se tomaron muestras del medio cada 2-5 min y las concentraciones de nitrito se determinaron colorimétricamente (Snell y Snell, 1949).

## **3. Métodos Analíticos.**

### **3.1 Determinación de crecimiento celular y clorofila.**

La estimación del crecimiento celular de *C. reinhardtii* se llevó a cabo midiendo los valores de clorofila en los cultivos. La clorofila se determinó a 652 nm tras su extracción con acetona al 80% (Arnon, 1949).

### **3.2 Determinación de amonio.**

La concentración de amonio en cultivos celulares se determinó colorimétricamente a 410 nm según el método descrito por Conway (1962).

### 3.3 Determinación de nitrito.

El nitrito se determinó espectrofotométricamente a 540 nm (Snell y Snell, 1949), utilizando un coeficiente de extinción de  $56,75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Pineda y Cárdenas, 1988).

La acumulación intracelular de nitrito se determinó mediante HPLC en las condiciones descritas para el consumo de nitrato, y espectrofotométricamente a partir de pellas celulares.

Preparación de reactivos:

- Solución de SULFA: Sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 N.
- Solución de NNEDA: N-Naftil-Etilendiamina al 0,02% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada.

### 3.4 Determinación de proteína.

La concentración de proteína total se determinó colorimétricamente mediante dos métodos, uno el descrito por Bradford (1976), donde a 0,1 ml de muestra se le añadió 1 ml de reactivo Bradford y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 595 nm.

Otro método utilizado es el del ácido bicínico (Smith et al., 1985), en el que se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de muestra y 1 ml del reactivo estándar de trabajo, se incubaron 20 min a 37°C y se midió la absorbancia a 562 nm.

En cada determinación de proteína realizada, se hizo una recta de calibrado con seroalbúmina bovina como patrón.

Preparación de reactivos:

1. Bradford: Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 96% se añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85% (v/v), y se completó hasta 1 litro con agua desionizada. La solución se filtró y se almacenó a 4°C en oscuridad.
2. BCA:
  - Reactivo A: 1% 4,4'-Dicarboxi-2,2'-Biquinoleína (sal disódica) Ac. Bicínico, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,16% NaK(COO)<sub>2</sub>.(CHOH)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO<sub>3</sub>.  
El pH se ajustó a 11,25 con 0,1 N de NaOH.
  - Reactivo B: 4% CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O en agua desionizada.
  - Reactivo estándar de trabajo: 100 vol de reactivo A + 2 vol de reactivo B.

## 4. Electroforesis de proteínas.

### 4.1 SDS-PAGE.

La electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). El gel separador se preparó normalmente al 10% y el gel empaquetador al 4%. El volumen de muestra por pocillo fue de aproximadamente 25  $\mu$ l. Estas muestras contenían: 1% SDS, 10 mM DTT, 10 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% Glicerol, 0,1% azul de bromofenol y unos 50  $\mu$ g de proteínas. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se aplicaron a los pocillos. La electroforesis se llevó a cabo en una minicubeta (BIORAD) a 200 voltios durante 1 hora aproximadamente, hasta que el colorante alcanzó el final de la placa.

Preparación de reactivos:

- Acrilamida al 30%: La solución concentrada de acrilamida/bis (N,N'-bis-metilen-acrilamida) se preparó al 30%, en la proporción 36:5:1 en agua desionizada. La solución una vez preparada se filtró y se almacenó a 4°C en oscuridad.
- Laemmli A: Es una solución 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Para 100 ml se disolvieron 18,15 g de Tris base en 75 ml de agua desionizada, tras ajustar el pH con HCl se añadió H<sub>2</sub>O hasta 100 ml. Se almacenó a 4°C.
- Laemmli B: Es una disolución 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. Para 100 ml se disolvió 6,05 g de Tris base en 75 ml de agua desionizada, tras ajustar el pH con HCl se añadió H<sub>2</sub>O hasta 100 ml. Se almacenó a 4°C.
- Tampón de electroforesis: Es una solución 25 mM Tris base, 192 mM de Glicina y 0,1% SDS, pH 8,3. Para la preparación de 2 litros de tampón, se disolvieron en agua desionizada 6,05 g de Tris base, 28,80 g de Glicina y 2,00 g de SDS.
- Disolución de persulfato amónico (APS): Se preparó en el momento de uso (o se almacenó a -20°C) al 10% (p/v), disolviendo 10 mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> en 1 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

### 4.2 Electroforesis en condiciones nativas

La electroforesis en condiciones nativas se realizó como se describe en el apartado anterior, excepto que se utilizó el gel separador al 7% y que se omitió el SDS tanto de las muestras como del tampón de electroforesis.

### **4.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Los geles se tiñeron para proteínas en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v). Posteriormente se destiñeron mediante sucesivos lavados en acético/isopropanol (10% ácido acético, 10% isopropanol).

### **4.4 Tinción de actividad xantina deshidrogenasa.**

Se determinó por identificación de una banda de actividad xantina deshidrogenasa tras electroforesis en geles de poliacrilamida (Jovin et al., 1964). Para ello los geles se sumergieron en una mezcla de tinción específica que contenía: hipoxantina 1 mM y NBT 1 mM en tampón Tris-HCl 0,1 mM, pH 8,5. La reacción se desarrolló a 30°C. Una vez definidas las bandas de actividad, los geles se lavaron con agua destilada y se conservaron en acético al 7,5% (Fernández y Cárdenas, 1981).

## **5. Técnicas inmunoquímicas. Inmunodetección en filtros (western blotting).**

### **5.1 Electrotransferencia de proteínas.**

La electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa se realizó en un sistema de transferencia de Bio Rad (Trans-Blot<sup>®</sup> Transfer Medium, 0,45 micras), utilizando un tampón cuyo contenido por litro era de 3 g de Tris-base, 14 g de glicina y 200 ml de metanol.

Finalizada la electroforesis, se eliminó el gel concentrador. En contacto con el cátodo se colocaron 2 papeles secantes del mismo tamaño que el gel separador saturados en el tampón de transferencia, utilizando una pipeta a modo de rodillo para eliminar las burbujas. Sobre ellos se colocó el gel separador y seguidamente la membrana de nitrocelulosa, previamente humedecida en el tampón de transferencia. Finalmente se colocaron otras 2 piezas de papel secante saturados en el tampón en contacto con el ánodo.

La transferencia se llevó a cabo a 4°C a 75 voltios durante un periodo de tiempo entre 1-3 horas en función del tamaño de la proteína de estudio.

### **5.2 Tinción de proteínas en nitrocelulosa.**

Para la tinción de proteínas en nitrocelulosa se utilizaron dos soluciones que diferían en el colorante utilizado: rojo Ponceau y negro amido, siendo la solución de negro amido más sensible.

1. Solución de negro amido: Utilizada mayoritariamente en la tinción del marcador de peso molecular, lo que a su vez nos daba idea de la eficiencia en la transferencia. La membrana se sumergía durante 30 min, manteniendo agitación suave y continua en una solución que contenía por litro: 5 g de Negro Amido, 450 ml de metanol, 100 ml de ácido acético. Posteriormente se enjuagaba con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante y se desteñía con una solución al 10% de ácido acético y 10% de isopropanol.
2. Solución de Rojo Ponceau: Es una solución de tinción comercial de rojo Ponceau (electroforesis cellogel, *atom*) utilizada principalmente para visualizar las proteínas posteriormente a la transferencia y así poder cortar las calles donde han migrado. El colorante se elimina de la membrana tras sucesivos lavados con agua desionizada hasta no observar el color rojo. Este colorante no interfiere en los posteriores pasos de inmunodetección.

### 5.3 Inmunodetección específica de Fd-Ni1.

Una vez realizada la transferencia, la posición de las bandas correspondientes a la Fd-NiR se detectaron haciendo uso de anticuerpos policlonales anti-Fd-NiR de *C. reinhardtii* cedidos por los Drs. E Pajuelo y Antonio J. Márquez de la Universidad de Sevilla. Para ello se siguieron los siguiente pasos:

- a. La membrana se rehidrató en una solución TBS (Tris-HCl 20mM, pH 7,5 y NaCl 0,5 M).
- b. Posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo TBS al 0,5% (p/v) de leche en polvo no grasa, con agitación suave y continua.
- c. Pasado este tiempo se añadió el anticuerpo a una dilución 1:500 y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas, manteniendo la agitación suave pero continuada.
- d. El exceso de anticuerpos se eliminó con sucesivos lavados con TBS.
- e. A continuación se añadían los anticuerpos secundarios de conejo conjugados con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:1000 según las recomendaciones de la casa comercial, incubándose durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente el exceso de anticuerpos se eliminó con sucesivos lavados con TBS.
- f. El revelado se realizó por reacción de la peroxidasa, para ello se mezclaron dos reactivos previamente preparados: Solución A: Se disuelven 6 mg de 4-Cl-1-

naftol en 2 ml de metanol frío. Solución B: Se mezclan 10 ml de tampón TBS a temperatura ambiente y 6  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 3%. Las bandas resultantes de la inmunodetección aparecen en pocos minutos. La reacción se paró lavando con agua. La membrana se secó y se conservó en oscuridad debido a que el producto de la reacción de la peroxidasa es fotosensible.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron los comerciales de SIGMA.

## **Técnicas de clonación molecular. Manipulación de moléculas de DNA.**

### **6.1 Preparación de células competentes.**

En la obtención de células competentes de la estirpe de *Escherichia coli* seleccionada, en este caso DH5 $\alpha$ F' o XL1-Blue, a partir de una colonia aislada se inoculó un cultivo de LB durante toda la noche. Posteriormente, se diluyeron las células 100 veces en el mismo medio hasta alcanzar una  $A_{595}$  de 0,45-0,55 correspondiente a la fase exponencial de crecimiento, entre 30 y 180 min. Tras centrifugar las células a 2500-3500 r.p.m. durante 5-10 min, se resuspendieron en 0,5 volúmenes (respecto del cultivo diluido) de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 20mM, incubando las células en hielo durante 30 min. A continuación se centrifugó la suspensión de células y el precipitado se resuspendió en 0,1 vol de la solución fría de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 20 mM a la que se le añadió un 15% de glicerol. Para una mayor eficiencia de transformación, la solución de células competentes se mantuvo a 4°C durante una noche y al día siguiente se distribuyó en alícuotas de 200  $\mu$ l que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Sambrook et al., 1989).

### **6.2 Fraccionamiento de moléculas de DNA y purificación de fragmentos de restricción.**

Las moléculas de DNA fueron digeridas con las adecuadas enzimas de restricción, utilizando para ello las condiciones y tampones recomendados por la casa comercial (Pharmacia, BRL, Boehringer Mannheim). En las digestiones de plásmidos procedentes de minipreparaciones rápidas, se incluyó 1  $\mu$ g de ribonucleasa en la mezcla de digestión para la degradación del RNA contaminante en las preparaciones.

Los fragmentos de DNA se separaron según su tamaño en geles de agarosa normalmente al 0,8%, en 0,5 x TBE o 1 x TAE conteniendo 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de

etidio. El porcentaje de agarosa se modificó según el tamaño de los fragmentos a separar (Sambrook et al.,1989). Las muestras se cargaron en los pocillos del gel tras adicionar el tampón de carga al 1 x. Se utilizaron como marcadores de peso molecular:

- DNA del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII.
- DNA del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción HindIII.
- Marcador comercial 1 Kb (GIBCO BRL).

La electroforesis se llevó a cabo a 4-8 voltios/cm (cuando se utilizó TAE el voltaje fue menor). El DNA se visualizó mediante iluminación con luz ultravioleta de onda corta (220 nm) o de onda larga (340 nm) cuando se quería aislar algún fragmento de la digestión del DNA. La pieza de agarosa que contenía la banda de DNA a purificar, se escindió con un bisturí. Para el aislamiento del DNA se utilizó un método comercial GeneClean II<sup>R</sup> (BIO 101 Inc) basado en una matriz de sílice cambiadora de iones. La eficiencia del método fue del 75%.

Preparación de reactivos:

- Tampón de carga 10x: Solución que contiene azul de bromofenol (0,25%); xilenocianol (0,25%); 50% de glicerol.
- Tampón de electroforesis 5 x TBE: Solución que contiene Tris base (54 g/l); Ac. Bórico (27,5 g/l) y EDTA 10 mM (20 ml/l de EDTA 0,5 M, pH 8,0)
- Tampón de electroforesis 50 x TAE: Solución que contiene Tris base (242 g/l); Ac. Acético (57,1 ml/l) y EDTA 50 mM (100 ml de una solución EDTA 0,5 M pH 8,0).

### **6.3 Rellenado de extremos cohesivos de moléculas de DNA.**

El relleno de extremos cohesivos de moléculas de DNA para generar extremos romos, fue realizado por la acción del fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia), y se llevó a cabo a 37°C durante 45-60 min en presencia de 2 mM DTT y 1 mM dNTP.

### **6.4 Desfosforilación de extremos de moléculas de DNA.**

La desfosforilación de extremos de DNA se realizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) de la casa comercial Boheringer Mannheim, utilizando el tampón y las condiciones recomendadas.



## 6.5 Ligación de moléculas de DNA.

La ligación de moléculas de DNA se realizó con la enzima T4 DNA-ligasa (Pharmacia), utilizándose el tampón descrito por la casa comercial BRL: 0,25 M Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% PEG (protocolo para la preparación del tampón 5 x). Las ligaciones se llevaron a cabo a 14°C, durante 12 h. La relación plásmido/inserto se aumentó cuando se trataba de fragmentos con extremos romos o no cohesivos, así como el tiempo empleado en la ligación y se disminuyó la concentración de ATP a 0,5 mM.

## 6.6 Transformación de células competentes de *E. coli*.

Las células competentes se descongelaron manteniéndolas en hielo. Para cada transformación se utilizó una alícuota de 200 µl a la cual se le añadió el DNA plasmídico a transformar, 50-200 ng o la mezcla de ligación. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 30 min, pasado este tiempo se dió un choque térmico por incubación a 42°C durante 1,5 min y después se puso en hielo durante 1-2 min. Posteriormente, a temperatura ambiente se añadieron 800 µl de medio LB (cuando se transformó con la mezcla de una ligación se utilizó siempre un control de un plásmido, por ejemplo pUC 119). Se incubó 60 min a 37°C, sin agitación. Finalmente, se centrifugó el medio LB con las células transformadas y se resuspendió en un volumen mínimo del mismo medio. Se inocularon al menos dos placas con diferentes diluciones en medios LB con 100 µg/ml de ampicilina donde se seleccionaron las colonias que al integrar el plásmido han adquirido resistencia al antibiótico (Sambrook et al., 1989). También, se utilizó el medio anterior que contenía además X-Gal haciendo la selección entre colonias blancas (plásmido recombinante) y azules (plásmido nativo).

## 7. Plásmidos utilizados.

### 7.1 Plásmidos nativos.

En este trabajo los plásmidos utilizados han sido: pUC18, pUC119 y los plásmidos derivados de estos Bluescript KS y SK. Estas designaciones indican que la zona de clonación múltiple (donde se encuentran enzimas de restricción de corte único) está en la misma orientación de transcripción que el gen *lacZ*, desde la enzima de restricción KpnI a SacI o en la contraria. Esta zona de clonaje múltiple está flanqueada por los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 que pueden ser utilizadas para la síntesis de RNA *in vitro*,

siendo la elección del promotor la que determina la cadena del inserto clonado que se transcribe. Estos plásmidos tienen como características más relevantes que confieren resistencia al antibiótico ampicilina, lo que nos permite la selección de las colonias que hayan integrado el plásmido; es decir de las portadoras del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, que se ve interrumpido por la inserción de cualquier secuencia en la zona de multiclonación. Ello permite la selección por color (azul/blancas) de las colonias del plásmido original o recombinante. Otra característica a destacar es que poseen el origen de replicación del bacteriófago M13 (Sambrook et al., 1989).

## 7.2 Plásmidos recombinantes.

En este trabajo se utilizaron diferentes plásmidos recombinantes que contienen DNA de *C. reinhardtii*: el plásmido pMN24 que contiene la región genómica de la NR clonada en pUC119 (Sall/BamHI), así como los plásmidos pB6a-2 (pUC119, SmaI) y pB6a5.1 (pBSK, SmaI/SstI) que contenían fragmentos del gen *Nia1* (Fernández et al., 1989); pCo5T1 (SmaI/Sall) y pCo5T2 (Sall) que corresponde a la región genómica donde se encuentran localizados los genes que codifican proteínas de transporte de nitrato/nitrito *Nar2*, *Nrt2;1* y *Nrt2;2* clonados en pUC119 (Quesada et al., 1993; Galván et al., 1996); pB6a-6 que contiene las regiones 5' de los genes *Nar2* y *Nrt2;1* clonado en pBKS (EcoRI/SmaI); y plásmidos que contienen los cDNA de *Nar2* clonado en pBKS (EcoRI/HindIII), (4.1) de *Nrt2;2* clonado en pBKS (EcoRI/HindIII); y (FH) que corresponde al plásmido que contiene el extremo 3' de *Nrt2;1* clonado en pBKS (HindIII) y pRbcS2 que contiene la región genómica del gen *RbcS2* (Goldschmidt-Clermont y Rahire, 1986).

También se utilizaron los plásmidos recombinantes que contienen genes heterólogos de plantas: el plásmido pCIB400 que contiene el cDNA de NiR de espinacas clonada en pUC18 (EcoRI) (Back et al., 1988); el plásmido pCSL16 que contiene el cDNA de NR de *Nicotiana* clonado en pBKS (SstI/Sall) (Vaucheret et al., 1989) y el plásmido pBchI que contiene el cDNA de un transportador de nitrato de cebada clonado en pBKS (SmaI/HindIII) (Trueman et al., 1996).

## 8. Aislamiento de DNA plasmídico (doble cadena) de *Escherichia coli*.

Se utilizaron varios métodos de aislamiento de DNA en función de la calidad y cantidad requerida:

### **8.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina.**

El cultivo bacteriano (3 ml) en fase estacionaria de crecimiento se centrifugó a 5000 x g, y la pella celular se resuspendió en 100 µl de una solución de 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl, pH 8, 10 mM de EDTA y 5 mg/ml de lisozima para romper la pared celular, por este motivo el rendimiento de extracción de DNA se ve favorecido por congelación/descongelación de la pella. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se añadió 200 µl de una solución de 0,1 N de NaOH y 1% de SDS, preparada en el momento de ser utilizada. Se mezcló por inversión del tubo varias veces hasta observar una solución clara. Se evitó una agitación vigorosa para no extraer DNA cromosómico, y se incubó 5 min en hielo. A continuación se añadieron 150 µl de una solución fría de acetato potásico pH, 4,8, se mezcló vigorosamente en vortex y se mantuvo en hielo durante 5 min. El tubo se centrifugó a la máxima potencia en la microfuga a 4°C durante 5 min, el precipitado se desechó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo en donde se le añadió igual volumen de FCI (25/24/1). Se mezcló con vortex y con la fase acuosa se repitió la extracción. Finalmente se realizó una extracción de los restos de fenol en la fase acuosa con cloroformo (saturado en agua) y la fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 95%. Tras incubar 20 min a -20°C, se centrifugó y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70%. La pella se secó en una microcentrífuga de vacío y el DNA se resuspendió en 20-25 µl de agua o TE (solución de Tris-HCl 10 mM, pH, 8,0 y EDTA 1 mM) mediante vortex. El rendimiento de la minipreparación fue de 10-20 µg/ml de cultivo (Sambrook et al., 1989).

### **8.2 Minipreparaciones de DNA plasmídico por columna.**

Este método fue empleado para la obtención de DNA de buena calidad para transformación de *C. reinhardtii* y para las reacciones de secuenciación. Se utilizaron columnas Quiagen<sup>TM</sup>, siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia fue de 5-10 µg/ml de cultivo.

### **8.3 Minipreparaciones de DNA plasmídico por precipitación con PEG.**

Este método es una modificación de las minipreparaciones de DNA obtenido por lisis alcalina, en la que se realizaron sucesivos pasos de precipitación que consistieron en: 1. Se precipitó el volumen resultante de la adición de las tres soluciones para la lisis alcalina con 0,7 vol de isopropanol a temperatura ambiente. Un cambio adicional fue la

incorporación de RNasa en la primera solución de resuspensión de la pella bacteriana; 2. El precipitado resultante se disolvió en TE y se extrajo una vez con fenol (saturado en TE) y una segunda vez con cloroformo/isoamilalcohol (saturado en TE). La fase acuosa resultante se precipitó con 2,5 vol de etanol en frío con acetato potásico a una concentración final en la disolución de 1 M. 3. Una vez lavado el precipitado con etanol al 70%, se resuspendió en TE y se precipitó con 400 mM de NaCl y 6,5% de PEG 8000 en frío. El precipitado se lavó posteriormente con etanol al 70% al menos dos veces, para eliminar bien el PEG, se secó y resuspendió en agua destilada. La eficiencia fue de 2-5  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo.

#### **8.4 Maxipreparaciones de DNA plasmídico.**

En la obtención de DNA a gran escala, el protocolo utilizado fue el mismo que en las minipreparaciones por lisis alcalina aunque el volumen de las soluciones fue proporcional al de los cultivos celulares. Inicialmente se usó como inóculo un cultivo de células que había crecido en un pequeño volumen de medio durante la noche. Una vez tratadas las muestras con la solución de acetato potásico 5 M, pH 4,8, se formó un precipitado blanco muy aparatoso, por lo que tras centrifugar la solución se filtró a través de 3-4 capas de gasa estéril para eliminar restos celulares. No son necesarias las extracciones con FCI para desnaturalizar proteínas presentes en el extracto celular, ya que este método aísla el DNA plasmídico eficientemente. Debido al elevado volumen final tras la adición de las tres soluciones de la lisis alcalina, la precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 15 min. Se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 min, se desechó el sobrenadante, el precipitado se secó y resuspendió en 3,7 ml de tampón TE al que se le añadió 0,3 ml de bromuro de etidio de 10 mg/ml y 4 g de CsCl. La suspensión homogeneizada se centrifugó a 4000 r.p.m., eliminando de esa forma gran parte del RNA que precipitó en esta solución. La disolución se transfirió tubos de ultracentrífuga sellables por calor (quick-seal de la marca Beckman) de 5,1 ml. Se contrapesaron los tubos de las diferentes muestras junto con las arandelas y tapones metálicos correspondientes al rotor de la ultracentrífuga (NVT-90, Beckman). Para el enfoque de la banda de DNA plasmídico, se utilizó un programa secuencial: 90000 r.p.m. durante 1,5 h; 87000 r.p.m. 15 min; 83000 r.p.m. 15 min; 81000 r.p.m. 30 min; 80000 r.p.m. 30 min.

Al extraer los tubos del rotor se visualizó la banda fluorescente del DNA con luz ultravioleta de  $\lambda$  larga (320nm). Se extrajo mediante punción con una jeringa, para ello

previamente se cortó la parte superior del tubo o se hizo una punción para evitar que se haga vacío. El bromuro de etidio se extrajo con butanol saturado en TE, hasta no observar el color rosa del bromuro de etidio. La preparación se diluyó 3 veces con TE, para diluir la alta concentración de CsCl y se precipitó con 2,5 vol de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente (no en frío ya que precipitarían las sales). El precipitado se lavó al menos 2 veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 100-200  $\mu$ l de TE mediante vortex. El rendimiento obtenido fue de 1-5  $\mu$ g/ml de cultivo. El DNA se almacenó a 4°C hasta su utilización (Sambrook et al., 1989).

## 9. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Las concentraciones de DNA se determinaron mediante dos métodos. De forma aproximada se calculó la concentración de cada muestra por comparación de las intensidades de las bandas de DNA teñidos con bromuro de etidio correspondientes a la muestra problema y concentraciones conocidas de DNA del bacteriófago lambda tras electroforesis en geles de agarosa. El otro modo de cuantificación fue determinando espectrofotométricamente la absorbancia a 260 nm de muestras adecuadamente diluidas (Sambrook et al., 1989). El coeficiente de extinción molar utilizado fue de  $0,02 (\mu\text{g/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La calidad de las preparaciones se determinó calculando la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, que fue de 1,5-1,8.

Las concentraciones de RNA se determinaron espectrofotométricamente de igual modo que en las muestras de DNA, siendo el coeficiente de extinción molar utilizado  $0,025 (\mu\text{g/ml})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La relación de A 260/280 fue de 1,7-1,9.

## 10. Marcaje radiactivo de moléculas de DNA y RNA.

### 10.1 Marcaje de DNA.

El marcaje radiactivo de moléculas de DNA se llevó a cabo mediante “cebado al azar” y utilizando un kit comercial de Oligolabelling (Pharmacia). Esta técnica está basada en la incorporación de un desoxinucleótido (dCTP) marcado en posición  $\alpha$  con  $^{32}\text{P}$  (3000Ci/mmol) por acción del fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* en presencia de una mezcla de reacción que contiene el tampón adecuado para la

enzima, así como el resto de dNTPs sin marcar. El DNA se desnaturalizó previamente y se mantuvo en frío hasta la adición de la mezcla de reacción, la radiactividad y por último la enzima. La reacción transcurrió a 37°C.

Para la purificación de la sonda marcada, se utilizaron columnas empaquetadas con Sephadex G-50 en una pipeta *Pasteur*/jeringa de 1 ml con lana de vidrio (o un compuesto análogo denominado Perlon, de menor toxicidad) en el fondo (Sambrook et al., 1989). Se centrifugó a 3300 r.p.m. durante 4 min para eliminar el volumen vacío y posteriormente se añadió la sonda marcada centrifugando otra vez a la misma velocidad durante otros 4 min. La incorporación de desoxinucleótidos radiactivos se cuantificó mediante un contador de centelleo líquido (Beckman), tomando 1 µl de la sonda radiactiva en 2 ml de solución de centelleo (Beckman, Ready Gel™, para fases acuosas). El rendimiento del marcaje osciló entre  $3-4 \times 10^8$  c.p.m./µg de DNA.

## 10.2 Marcaje de RNA.

El marcaje de una sonda radiactiva de RNA se realizó utilizando *in vitro* los promotores de las RNA polimerasas T3 y T7 del plásmido pBSK donde se subclonó el fragmento de DNA que contiene el gen que se desea transcribir. Para evitar transcripciones incompletas, el tamaño de las sondas de RNA estaban comprendidas entre 100-500 pares de bases. En la reacción de marcaje se utilizó un ribonucleótido (UTP) marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$  en posición  $\alpha$  (ICN), siendo las condiciones empleadas las siguientes: El DNA digerido con la adecuada enzima de restricción se purificó mediante Gean-clean II<sup>R</sup> (BIO 101 Inc). Se evitó utilizar restrictasas que generen extremos 3' protuberantes según recomendación del fabricante, pero en caso contrario se trató con Klenow previamente al uso de la RNA polimerasa en su mismo tampón durante 15 min a 22°C (actividad endonucleasa 3'→5'). Posteriormente se añadió 10 nmoles de los ribonucleótidos ATP, GTP, CTP, 1 nmol de UTP sin marcar con  $^{32}\text{P}$ , 40 U de inhibidor de ribonucleasas, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] UTP 50 µCi (3000 Ci/mmol) y 20 U de T3 o T7 RNA polimerasa. La reacción se desarrolló a 37°C durante 1 h. Se tuvo la precaución de hacer la mezcla con los reactivos a temperatura ambiente, debido a que el tampón de la polimerasa contiene espermidina (20 µmol/ml) y precipita en frío con el DNA.

Las ribosondas para la detección de *Nrt2;1* y *Nar2* se sintetizaron utilizando como molde un fragmento de DNA genómico SacI-SphI (820 pb) del plásmido B6a6 contenido en pBSK, y que corresponde a la región de DNA genómico donde se sitúa la región promotora común

para los genes *Nar2* y *Nrt2;1* y los extremos 5' de los correspondientes mRNAs (Quesada et al., 1993) (fig.4). Mediante digestión de este DNA con las restrictasas *SacI* o *PvuII* (*Nar2*) y *HindIII* (*Nrt2;1*) se sintetizó una cadena de ribonucleótidos antisentido para *Nar2* de aproximadamente 200 pb que contiene 158 pb de secuencia codificante para *Nar2* y su extremo 5', y para *Nrt2;1* de 150 pb con 36 pb de secuencia codificante para *Nrt2;1* y su extremo 5' no traducido, a partir de los promotores de la RNA polimerasas T7 y T3 respectivamente. Para la obtención de la sonda de RNA para *Nrt2;2* se tomó como DNA molde un fragmento de DNA genómico *EcoRV-HindIII* que corresponde al extremo 3' de *Nrt2;2* contenido en el plásmido 4.1 en pBSK (Quesada et al., 1994). El DNA se digirió con la restrictasa *EcoRV* y se sintetizó una cadena de RNA de 370 pb a partir del promotor T7 de la RNA polimerasa.

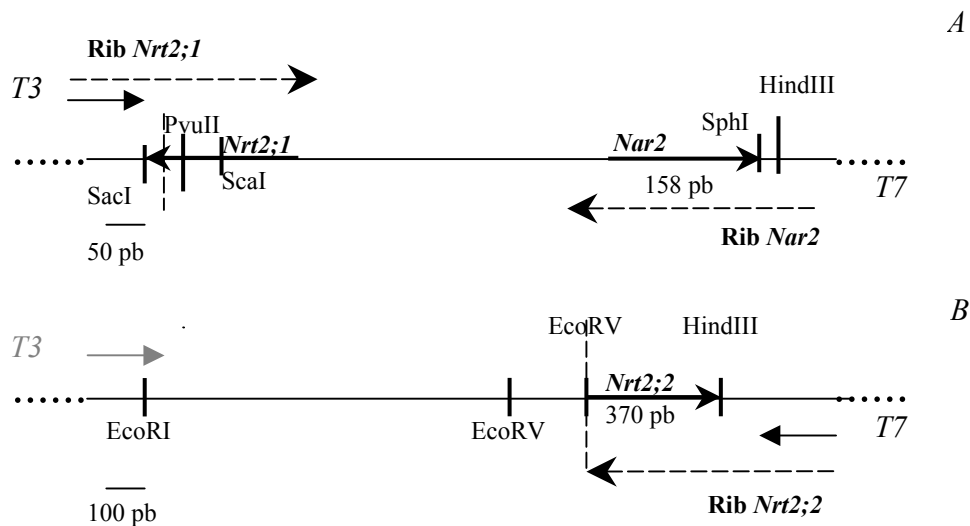


Fig.4. Obtención de ribosondas específicas para los genes *Nar2*, *Nrt2;1* y *Nrt2;2*.

A: Se muestra el fragmento de DNA genómico de *C. reinhardtii* de 820 pb (*SacI/SphI*) del plásmido B6a6 en pBSK linealizado (línea de puntos) que contiene la secuencia de la zona promotora común de *Nar2* y *Nrt2;1*, secuencia del extremo 5' y parte de secuencia codificante de estos genes. Este DNA se utilizó como molde para obtener RNA a partir de los promotores de las RNA polimerasas. Por el ensayo de protección de ribonucleasas se obtiene RNA marcado de *Nar2* de 200 pb (T7) y *Nrt2;1* de 150 pb (T3).

B: Se muestra el plásmido 4.1 en pBSK linealizado (línea de puntos) que contiene un fragmento de DNA genómico de *C. reinhardtii* *EcoRV-HindIII* que corresponde al extremo 3' no traducido de *Nrt2;2*. Este DNA se utilizó como molde para la síntesis de RNA a través del promotor T7 de la RNA polimerasa originando una cadena de RNA protegido de 370 pb.

Para la purificación de la sonda radiactiva de los nucleótidos no incorporados, se filtró por una columna de G50 (Nick<sup>TM</sup> columns; Pharmacia) equilibrada con agua tratada con DEPC (Sambrook et al., 1989).

## 11. Aislamiento de DNA genómico de *C. reinhardtii*.

En la obtención de DNA genómico del alga verde *C. reinhardtii*, se utilizaron dos métodos que difieren en la calidad del DNA obtenido y en el tiempo empleado en el aislamiento.

### 11.1 Maxipreparación de DNA genómico de alta calidad.

En este método de aislamiento de DNA genómico, las células se obtuvieron por centrifugación a 4000 r.p.m. a partir de 250 ml cultivo. Después de eliminar bien el medio de cultivo, se resuspendieron en 0,68 ml de agua desionizada siendo el volumen final de la suspensión de 2,27 ml. Se le añadió 0,427 ml de una solución de 20% de SDS agitándose por inversión, e inmediatamente se le añadieron 0,622 ml del tampón de extracción 5 x que contenía: 345 mM Tris-HCl, pH 8, 1,38 M NaCl y 138 mM EDTA. La preparación se incubó 1 h a 50°C y a continuación se añadieron 3,64 g de CsCl y 0,215 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml) mezclándose durante 10 min. Las muestras se ultracentrifugaron utilizando un rotor basculante (SW50.1 Ti, Beckman) a 43000 r.p.m. durante 24 h a 20°C. La banda de DNA genómico se visualizó mediante luz ultravioleta de  $\lambda$  larga, extrayéndose por punción. El bromuro de etidio presente en las muestras se extrajo con alcohol isoamílico/butanol saturado en TE, hasta su eliminación y la alta concentración de sales de ClCs se diluyó con 3 vol de agua/TE. A continuación se precipitó con 2,5 vol de etanol o 1 vol de isopropanol durante 15 min. Las preparaciones se centrifugaron a 10000-12000 r.p.m., el precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó en una microcentrífuga de vacío y se resuspendió en 100-250  $\mu$ l de TE. El rendimiento obtenido osciló entre 0,2-0,4  $\mu$ g/ml de cultivo. Las preparaciones se almacenaron a 4°C (Ranum et al., 1988).

### 11.2 Minipreparación de DNA genómico.

Las células de *C. reinhardtii* se obtuvieron a partir de un cultivo en placas de medio sólido. Para esta minipreparación la cantidad de células fue la correspondiente al llenado de un asa de siembra. Se pusieron en suspensión en 0,45 ml de un tampón cuya composición era 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,3 M NaCl y 5 mM EDTA. Una vez homogenizada, se añadió SDS al 2% para lisar las células mediante vortex. Se realizaron 2-3 extracciones con FCI y una con cloroformo saturado en agua. La fase acuosa resultante se precipitó con 2,5 vol de etanol durante 1h a -20°C. Tras centrifugar, el precipitado obtenido se lavó 2 veces con etanol al 70% y se secó en una microfuga de



vacío. La pella de DNA se resuspendió en 25-40  $\mu\text{l}$  de agua. El rendimiento de la extracción de DNA fue de aproximadamente 4-8  $\mu\text{g}$ /extracción (40-80  $\mu\text{g}/\text{g}$  de peso húmedo de células). La calidad del DNA obtenido era lo suficientemente buena como para ser digerido con las enzimas de restricción y amplificación por PCR.

Aunque el rendimiento era menor que en las preparaciones con CsCl, el tiempo empleado es 10 veces menor.

## **12. Fraccionamiento, transferencia y condiciones de hibridación de DNA de *C. reinhardtii*.**

### **12.1 Fraccionamiento.**

La digestión de DNA genómico con enzimas de restricción se llevó a cabo a 37°C durante 10-15 h en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  que contenía: 1,5-2,5  $\mu\text{g}$  de DNA y 20-30 U de enzima (salvo excepciones como SmaI, a 30°C). Se utilizaron volúmenes grandes de digestión para minimizar el posible efecto de impurezas en las preparaciones. El DNA digerido se precipitó con 2,5 vol de etanol con acetato sódico 0,3 M, para evitar problemas en la migración del gel de agarosa debido a diferentes concentraciones de sales en las diferentes digestiones con restrictasas. Los productos de digestión se fraccionaron en geles de 0,8% de agarosa en tampón 0,5 x TBE y con 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bromuro de etidio, a 1,2 voltios/cm durante 12-16 h.

### **12.2 Transferencia.**

Finalizado el fraccionamiento de moléculas de DNA, se fotografió el gel con una regla graduada situando el cero en los pocillos del gel. Se utilizaron como patrones de peso molecular un marcador comercial 1 Kb (Stratagene) o DNA del fago  $\lambda$  digerido con HindIII o con HindIII y EcoRI. Previamente a la transferencia de DNA a las membranas de nylon, el gel de agarosa que contenía el DNA fragmentado se sometió a un tratamiento de despurinización para facilitar su transferencia, sumergiendo el gel en una solución 0,25 N de HCl durante 8-10 min a temperatura ambiente con agitación suave (los pasos posteriores también se realizaron con agitación suave). El gel se lavó con agua desionizada y se transfirió a una solución desnaturizante que contenía 1M NaCl y 0,5 M de NaOH durante 15 min, pasado este tiempo se enjuagó con agua y se transfirió a una solución neutralizante de 0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl a pH 7,4.

La transferencia del DNA fragmentado a membranas de nylon (Nytran 0,45  $\mu\text{m}$  de Schleicher & Schuell o Hybon<sup>TM</sup>-N de Amersham) se realizó por capilaridad (Sambrook et al., 1989), siendo el tampón utilizado 10 x SSC. La membrana previamente se humedeció con agua y se equilibró con 5 x SSC. La transferencia se llevó a cabo durante 12-15 h, luego se enjuagó en 2 x SSC y 0,2% SDS y el DNA se fijó a la membrana por calor, a 80°C durante 1,5-2 h o por luz ultravioleta (UV Stratalinker<sup>TM</sup> 2400, Stratagene).

### 12.3 Condiciones de hibridación.

La prehibridación se realizó a 42°C durante 1-2 h en una solución que contenía 6 x SSC, 10 x Denhardt's, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fragmentos desnaturalizados de DNA de esperma de salmón y 1% de SDS. Pasado este tiempo, se eliminó la solución de prehibridación y se substituyó por la solución de hibridación que contenía 50% de formamida desionizada, 6 x SSC, 1 x solución de Denhardt's, 0,3% SDS y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fragmentos de DNA desnaturalizados de esperma de salmón. A la solución de hibridación se le incorporó la sonda marcada radiactivamente previamente desnaturalizada a 95°C durante 2-3 min, con una radiactividad específica de  $1-5 \times 10^6$  c.p.m./ml de solución. La hibridación se llevó a cabo durante 15-24 h a 42°C.

Las condiciones de lavado fueron: dos lavados de 30 min a 60°C en una solución 2 x SSC y 0,2 x SDS en agitación continua, y otros dos lavados de 30 min a 65°C en una solución 0,2 x SSC y 0,2 x SDS manteniendo la agitación continuada. Las membranas impresionaron películas de autorradiografía (X-OMAT<sup>TM</sup>) LS de baja sensibilidad o (X-OMAT<sup>TM</sup>)AR de alta sensibilidad de la casa Kodak, con pantallas amplificadoras de señal a -80°C. Para la reutilización de la membrana, la sonda radiactiva se eliminó introduciendo la membrana en una solución hirviendo de SDS al 0,5% en donde se dejó hasta que alcanzase la temperatura ambiente.

Preparación de soluciones:

- Solución 20 x SSC: 15 mM de citrato sódico, 150 mM de NaCl.
- Solución Denhardt's 100 x: 2% polivinilpirrolidona (PVP), 2% BSA, 2% Ficoll.
- DNA de esperma de salmón: Se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada. La solución de DNA se sonicó durante 8 min al 30% de potencia en un sonicador Vibra Cell (Sonic & Materials INC).

- Formamida desionizada: En la desionización de la N-N-dimetil-formamida se utilizó una relación 1/10 (p/v) de resina Biorad AG 501-X8. La solución se mantuvo en agitación con la resina durante 30-60 min a temperatura ambiente. La resina se eliminó de la disolución filtrándola a través de una doble capa de papel de filtro. La solución se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  dispensada en alícuotas.

### 13. Aislamiento de RNA de *C. reinhardtii*.

En la obtención de RNA se trabajó en un entorno libre de ribonucleasas, por ello se trataron con DEPC al 0,1% las soluciones que se utilizaron para aislar RNA (Sambrook et al., 1989). En este trabajo se han utilizado dos métodos de aislamiento.

Se recogieron 50-200 ml de cultivos en la fase exponencial de crecimiento. Se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 5 min, y las células se resuspendieron en un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA y SDS al 2% a una concentración de  $0,5-2 \times 10^8$  células/ml. La suspensión de células se mantuvo en agitación 15 min a temperatura ambiente. En este paso las células se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  o se procesaron (Schloss et al., 1984).

La obtención de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante 2-3 extracciones con FCI y una última extracción con Cloroformo a  $4^{\circ}\text{C}$ , estando las dos soluciones orgánicas saturadas en TE. El RNA se precipitó selectivamente en una solución 2 M de LiCl durante al menos 4 h a  $4^{\circ}\text{C}$  (Sambrook et al., 1989). La solución se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 30 min, y el precipitado de RNA resultante se lavó dos veces con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales. La pella se secó en una microfuga de vacío y se resuspendió en agua. La solución de RNA se volvió a precipitar con 2,5 vol de etanol y 0,3 M de acetato sódico, pH 4,8, durante 1-2 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La preparación se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 30 min. Se lavó la pella de RNA con etanol al 70%, se secó en una microfuga de vacío y se resuspendió en agua. El rendimiento obtenido fue de 2-10  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo.

El otro método de aislamiento utilizado es una modificación del anterior. Se procesaron volúmenes inferiores de células, entre 10-50 ml de cultivo en la fase exponencial de crecimiento. La pella celular se resuspendió en 0,5 ml del mismo tampón anteriormente indicado (lo que nos permitió trabajar en tubos de 1,5-2 ml) que se congelaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. La suspensión se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$

durante 5 min. Se añadió ATA a una concentración 2 mM y se agitó. A continuación se añadió 2-β-mercaptoetanol a una concentración 14 mM y se incubó a 65°C durante 5 min, mezclándose por inversión durante otros 5 min. Se añadió KCl a una concentración 0,5 M, se mezcló mediante vortex y se incubó en hielo durante 10 min. La suspensión se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. Los pasos posteriores son los mismos que los descritos anteriormente de extracción con FCI y sucesivas precipitaciones con LiCl y etanol. El rendimiento obtenido fue similar al anterior.

## **14. Fraccionamiento, transferencia y condiciones de hibridación de RNA de *C. reinhardtii*.**

### **14.1 Fraccionamiento.**

El fraccionamiento de RNA total, se llevó a cabo en geles de agarosa al 1,2-1,5%, 1 x MOPS y 17,5% de formaldehído, añadiéndose éste una vez fundida la agarosa en el tampón a una temperatura no superior a 65°C. El RNA total (15-30 µg) se desnaturalizó previamente por calentamiento a 65°C durante 5 min en una solución que contenía 19% de formamida desionizada, 0,7% de formaldehído, 0,19% de MOPS, 0,019% EDTA, 0,01% de BPB y 1,9% de glicerol. La electroforesis se desarrolló a 1,2 voltios/cm durante 16-20 h en tampón 1 x MOPS, pH 7,0.

### **14.2 Transferencia.**

Finalizado el fraccionamiento del RNA total, se hizo una fotografía del gel poniendo una regla graduada como referencia, situando el cero en los pocillos del gel. En las electroforesis de RNA de *C. reinhardtii* se consideraron como marcadores de peso molecular a los RNA ribosómicos de 3,0 y 1,2 Kb. El RNA fue transferido por capilaridad utilizando 10 x SSC como tampón de transferencia durante 16-20 h (Sambrook et al. 1989). La membrana de nylon (Nytran 0,45 µm de Schleicher & Schuell o Hybon<sup>TM</sup>-N de Amersham) se humedeció previamente en agua y se equilibró con 5 x SSC.

Tras la transferencia, la membrana se enjuagó en una solución 2 x SSC, 0,2 x SDS y el RNA se fijó por calor a 80°C durante 1,5-2 h o mediante luz ultravioleta (Stratalinker).

### **14.3 Condiciones de hibridación.**

La prehibridación e hibridación de membranas con RNA de *C. reinhardtii* se desarrolló a 42°C en una solución única con 50% de formamida, 5 x SSC, 1% de SDS, 5

x solución de Denhardt's, fosfato sódico 50 mM, pH 7, y 100  $\mu\text{g/ml}$  de fragmentos desnaturalizados de DNA de esperma de salmón. La prehibridación se llevó a cabo durante 2-4 h, pasado este tiempo se incorporó la sonda de DNA marcada radiactivamente ( $1-5 \times 10^6$  c.p.m./ml) y previamente desnaturalizada a 95°C durante 2-3 min. La hibridación se realizó durante 16-20 h. Pasado este tiempo, la membrana se lavó para eliminar la radiactividad que se había unido inespecíficamente, primero a temperatura ambiente con 0,2 x SSC, 0,2 x SDS. Posteriormente se realizaron 3 lavados a 65°C de 15 min cada uno con la misma solución, siempre con agitación constante. Las membranas, entre plásticos para mantenerlas con humedad, impresionaron películas de autorradiografía (Kodak), a -80°C con pantallas intensificadoras de señal.

Para la reutilización de las membranas, la sonda radiactiva se eliminó sumergiendo las membranas en una solución hirviendo al 0,5% de SDS hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Preparación de reactivos:

- Tampón de electroforesis 10 x MOPS, pH 7,0: Es una disolución 400 mM MOPS, donde se disolvieron 41,86 g de MOPS en 400 ml de agua destilada, el pH se ajustó con NaOH desde 3.5 a 7,0 y se completó el volumen hasta 500 ml.
- Tampón fosfato 1 M, pH 7,0: La preparación de una disolución tampón de fosfato sódico 1 M, pH 7,0 se llevó a cabo a partir de dos disoluciones concentradas de 10 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (57,7 ml) y 10 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (42,3 ml).

## 15. Método de detección de mRNA específicos con ribosondas.

En la detección de mRNA específicos, se empleó un método comercial basado en la hibridación de una ribosonda marcada radiactivamente y RNA total aislado de un cultivo de *C. reinhardtii* en un medio adecuado (RNase Protection kit, Boehringer Mannheim). El producto de la hibridación se separó en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones desnaturalizantes, en presencia de urea 7 M, utilizando como tampón de electroforesis una solución tamponada de Tris-Borato (condiciones indicadas por el fabricante). Se utilizó como marcador de peso molecular DNA del plásmido PUC 18 digerido con Sau3A. La transferencia se realizó por capilaridad a una membrana de nylon, que posteriormente impresionaron películas de autorradiografía (Kodak).

## 16. Análisis genético de estirpes de *C. reinhardtii*.

### 16.1 Complementación *in vivo* (obtención de diploides).

Las células de las estirpes a analizar se cultivaron en medio sólido con amonio 8 mM como fuente de nitrógeno. Para la inducción de la formación de gametos se transfirieron a medio líquido sin nitrógeno o H<sub>2</sub>O durante 14-16 h, exponiéndose en a luz intensa (20-25 W/m<sup>2</sup>) en la cámara de cultivo a 25°C. Posteriormente las suspensiones de gametos de sexos diferentes (mt <sup>+/-</sup>) se mezclaron y se expusieron a la luz durante 1,5-2 h para la formación de cigotos. La suspensión de cigotos se transfirió a placas de medio sólido selectivo con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fernández y Matagne, 1986). En la selección de estirpes diploides por cruce de dos haploides, las mutaciones que tengan estas estirpes deben ser de auxotrofia diferentes, para que los diploides sean viables en medio mínimo. Las mutaciones deben afectar a genes diferentes o permitir la complementación interalélica (Fernández y Matagne, 1986). Al cabo de 5-7 días de exposición a luz continuada (para evitar la maduración de los cigotos), empezaron a aparecer las colonias de los diploides, en el caso de complementación positiva, que proceden de la germinación vegetativa del 4% de los cigotos (Ebersold, 1967).

### 16.2 Análisis de segregantes obtenidos por cruce genético.

Los cruces genéticos entre estirpes de *C. reinhardtii*, se realizaron mediante análisis de esporas al azar según el método de Levine y Ebersold (1960) modificado. La inducción de gametos y formación de cigotos se desarrolló del mismo modo descrito anteriormente. Posteriormente a la formación de los cigotos, estos se transfirieron de forma heterogénea a placas de medio sólido mínimo con NH<sub>4</sub>Cl 8 mM como fuente de nitrógeno y 4% de agar, en donde los cigotos quedan incrustados. Las placas permanecieron en la luz durante 12-14 h y posteriormente se pusieron en oscuridad durante 5-7 días para la maduración de los cigotos. Pasado este tiempo, las células vegetativas se eliminaron afeitando las placas con una cuchilla estéril y las células restantes se mataron con vapores de cloroformo durante 2 min. Se seleccionaron bloques de agar con aproximadamente 50 cigotos, visualizándolos con el microscopio óptico o la lupa binocular, y se transfirieron a placas de medio sólido de mínimo NH<sub>4</sub>Cl colocándolas bajo luz tenue durante 12-16 h para la germinación de los cigotos y formación de esporas. Tras este tiempo, las esporas se extendieron tras adicionar H<sub>2</sub>O sobre los bloques que contenían inicialmente los cigotos. Pasados 5 días aparecieron colonias, cada una de ellas, representante de un producto

meiótico, se transfirieron a diferentes medios sólidos de selección adecuados para estudiar la segregación del cruce.

### 17. Mutagénesis en medios con clorato.

La mutagénesis por clorato de las estirpes Tx11-8 y NRcG1 se llevó a cabo en medios sólidos que contenían  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8 mM y  $\text{KClO}_3$  100 mM, partiendo inicialmente de una suspensión de células de *C. reinhardtii* en  $\text{H}_2\text{O}$  de aproximadamente  $10^7$  células/ml. Al cabo de 5 días aparecieron colonias resistentes, en una relación aproximada de una colonia resistente por cada  $10^5$  células. Las colonias se mantuvieron bajo la presión selectiva de  $\text{ClO}_3^-$ , utilizando medios sólidos que contenían  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8 mM y  $\text{KClO}_3$  10 mM, aunque no en los medios de cultivo líquidos utilizados para su posterior análisis.

### 18. Transformación de células de *C. reinhardtii*.

Se han utilizado diversos métodos en la transformación, con el objeto de aumentar la eficiencia de transformación, aunque básicamente son modificaciones del método descrito por Kindle (1990). Las células crecidas hasta fase exponencial de crecimiento en medio mínimo con amonio, se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente se lavaron con medio sin nitrógeno estéril y se concentraron 25 veces en el mismo medio. La mezcla de transformación contenía: 1 ml de células, PEG 8000 (estéril por filtración) a una concentración final del 5%, 0,3 g de perlas de vidrio silanizadas o tratadas con ácido y esterilizadas a  $180^\circ\text{C}$ , y 1  $\mu\text{g}$  de DNA. El PEG se añadió en último lugar e inmediatamente se agitaron las células en el vortex. El tiempo de agitación dependió de las estirpes, los mutantes de pared  $cw^-$ , 15 segundos dos veces con un intervalo de 1 min entre ambas, y la estirpes  $cw^+$  1 min dos veces con un intervalo de 1 min entre ambas. Tras la agitación, para eliminar el PEG, se añadió rápidamente 10 ml de medio sin nitrógeno y se centrifugó a 3500 r.p.m. Las células se resuspendieron en un volumen de 0,5 ml de medio sin nitrógeno y se plaquearon en los correspondientes medios de selección.

Otras modificaciones realizadas fueron:

- La utilización de autolisina de *C. reinhardtii* en estirpes que no poseían la mutación de pared, y por tanto con menor eficiencia de transformación (Kindle, 1990).

- El uso combinado de autolisina y electroporación, incorporando sacarosa (40 mM) al medio sin nitrógeno estéril empleado a lo largo de todo el proceso de transformación (Shimogawara et al., 1998)

Se han realizado las siguientes transformaciones:

1. Las estirpes mutantes *Nii-1*, M1, M2, M3 y M4 (este trabajo), con una construcción que contiene el cDNA de *Nii1* de espinacas, bajo el promotor de la rubisco (*RbcS2*) de *C. reinhardtii* clonado en pUC 119.
2. La estirpe mutante de los HANT S10 (Quesada et al., 1994) con construcciones que contienen el cDNA de cebada *Bch1* bajo el promotor del gen de rubisco (*RbcS2*)
3. La estirpe 305-cw15 (Sosa et al., 1978) con la construcción pRbcS2-NR<sub>Nic2</sub> y el plásmido pMN24 que contiene el gen homólogo de NR.
4. La estirpe delecionada P4 de NR con la construcción pRbcS2-NR<sub>Nic2</sub> y el plásmido pMN24 que contiene el gen homólogo de NR.

### **19. Obtención de autolisina de *C. reinhardtii*.**

El proceso de obtención de autolisina se llevó a cabo en varios pasos detallados a continuación:

- Se crecieron las estirpes silvestres de *C. reinhardtii*, 6145c y 21gr (mt<sup>-</sup>, mt<sup>+</sup>) en medios con amonio.
- Los cultivos de células se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 min y la pella celular se resuspendió en un medio carente de fuente de nitrógeno para la inducción de gametos, manteniéndolas en este medio durante la noche.
- Los cultivos de células se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 min y resuspendieron en medio sin nitrógeno hasta alcanzar una concentración celular de  $4 \times 10^7$  cél/ml.
- Las suspensiones de células se mezclaron durante 1-2 h para la fusión de los gametos.
- Pasado este tiempo, eliminamos las células vegetativas y los cigotos generados mediante sucesivas centrifugaciones a 3500 y 14000 r.p.m. durante 5 y 15 min respectivamente. En el sobrenadante, es donde se encuentra la proteína autolisina producida en el proceso de fusión de los gametos.



- La autolisina se concentró por liofilización, se resuspendió en el mínimo volumen posible de medio sin nitrógeno, y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- La actividad de estas preparaciones se determinó tomando suspensiones de células con pared que se incubaron con la autolisina. A continuación las células se trataron con una solución al 0,075% Tritón X-100 (Merck) y 5 mM EDTA, pH 8, se agitaron vigorosamente durante 5-10 seg y se centrifugaron a 15000 g. Si el tratamiento con autolisina es eficiente, el detergente provoca la lisis de la célula que se cuantifica midiéndose la absorbancia a 435 nm.

La autolisina se almacenó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con glicerol estéril al 50%.

## 20. Otras técnicas.

### 20.1 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.

Se llevaron a cabo amplificaciones de secuencias de DNA genómico de *C. reinhardtii* (50 ng) en un termociclador (PTC-100<sup>TM</sup>, Peltier-Effect Cycling, MJ. Research, Inc.) utilizando cebadores internos (50 pmoles de cada) por acción de la polimerasa Taq (Perkin Elmer). La reacción se desarrolló en presencia de 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTP, 1 x del tampón comercial recomendado por el fabricante.

### 20.2 Secuenciación de DNA.

Los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se comprobaron por secuenciación mediante un secuenciador automático (ABI-310 Perkin Elmer) con terminadores fluorescentes. Se utilizaron los cebadores universales forward y reverse en las reacciones de secuenciación con la enzima Taq polimerasa, siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 20.3 Actividad fotosintética. Electrodo de $\text{O}_2$ .

La actividad fotosintética se determinó en función de la producción de  $\text{O}_2$  utilizando un electrodo de  $\text{O}_2$ . Las medidas se realizaron a  $25^{\circ}\text{C}$ , siendo la difusión del  $\text{O}_2$  a esta temperatura de  $0,25 \mu\text{mol O}_2 \text{ ml}^{-1}$ . La suspensión de células (1 ml) estaba en continua agitación e iluminada con luz blanca saturante. Los registros se tomaron a una velocidad de carta constante de  $1 \text{ cm. min}^{-1}$  y una sensibilidad de 100 mV. En cada medida se

mantuvieron constantes todos los parámetros, incluida distancia del foco de luz a la celdilla donde se encontraban las células.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN I:  
CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
MUTANTES DE NiR**

## RESULTADOS I: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE NiR

### Construcción de mutantes de NiR.

Mediante la construcción de mutantes de NiR de *C. reinhardtii*, se trata de estudiar cómo la deficiencia de una NiR funcional afecta a la expresión de genes de la asimilación de nitrato (HANT, NR). En este organismo se ha demostrado que mutaciones o tratamientos que dan lugar a una NR no funcional, resultan en un patrón de desregulación y sobreexpresión de los transcritos *Nia1*, *Nrt2;1*, *Nrt2;2* (Quesada y Fernández, 1994) y las actividades de transporte y reducción de nitrito (Galván et al., 1992). Estos hechos han llevado a proponer que la NR tiene un papel regulador a través de su propia actividad u otro mecanismo asociado a la proteína. Sin embargo, no se puede descartar que sea la ausencia de metabolitos derivados de la reducción de nitrato la causa de este patrón de desregulación, como ocurre en plantas superiores (Shiraishi et al., 1992; Vaucheret et al., 1992; Duncanson et al., 1993).

Los mutantes de NiR de *C. reinhardtii* se han obtenido mediante cruce genético entre estirpes que presentan deleciones en genes localizados en la agrupación génica de *Nia1* y transformantes que poseen copias de genes para la NR y HANT integradas heterológamente (G1x 04.1, Fig.5). La estirpe G1 está delecionada en toda la región genómica que contiene la agrupación de genes para la asimilación de nitrato ( $\Delta$  *Nia1*, *Nii1*, *Nrt2;1*, *Nrt2;2*, *Nar1*, *Nar2*) (Quesada et al., 1993). La estirpe 04-1 está delecionada parcialmente en la región genómica de *Nia1*, contiene el gen de la NiR (*Nii1*), y posee los genes de la NR y HANT, adquiridos por cruce genético y transformación respectivamente (Quesada et al., 1994). El cruce entre estas dos estirpes G1 y 04-1 nos permitió segregar independientemente los genes de NR, NiR y HANT al no estar ligados genéticamente a *Nia1*. Para analizar el resultado de la segregación en este cruce, se comprobaron 100 segregantes según su crecimiento en placas de medio sólido con nitrato 4 mM o nitrito 2 mM, siendo el resultado obtenido 55:45 ( $Nii^+/Nii^-$ ) y 16:84 ( $Nit^+/Nit^-$ ). Se determinó la actividad NR de 7 estirpes segregantes incapaces de crecer en nitrato y nitrito ( $Nit^-$ ,  $Niit^-$ ), seleccionándose de esta manera 4 estirpes que tenían NR funcional (M1, M2, M3 y M4) pero que carecían de actividad NiR.

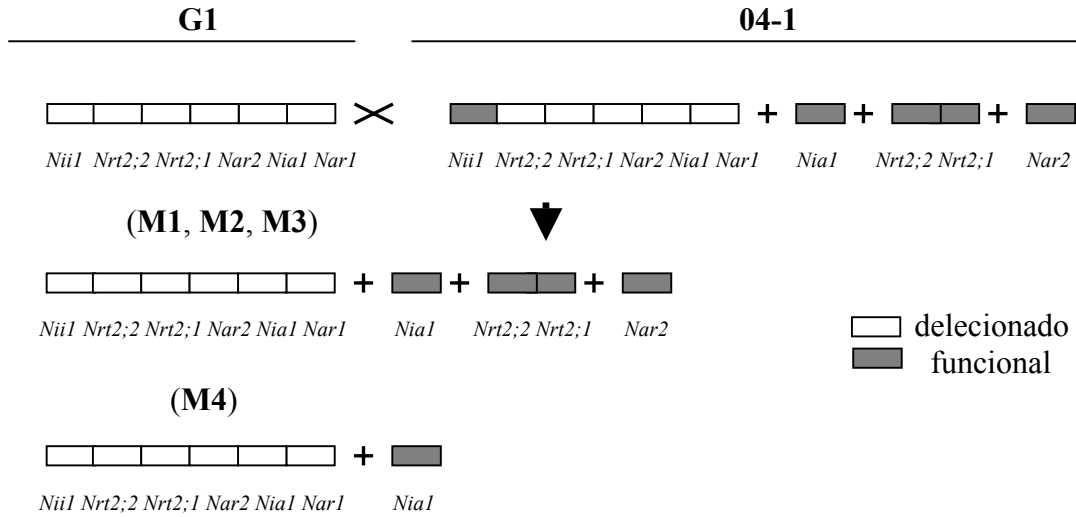


Fig.5. Cruce genético entre las estirpes G1 y 04-1. Se muestran los genotipos de las estirpes parentales y los mutantes de NiR aislados de entre los segregantes del cruce.

Con el objetivo de comprobar en estas estirpes la presencia de los genes de HANT, se aisló RNA a partir de células inducidas durante 3 h en medios con nitrato 4 mM. Como muestra la figura 6, las estirpes M1, M2 y M3 expresaban los transcritos de *Nrt2;1* y *Nar2* mientras que la estirpe M4 no.

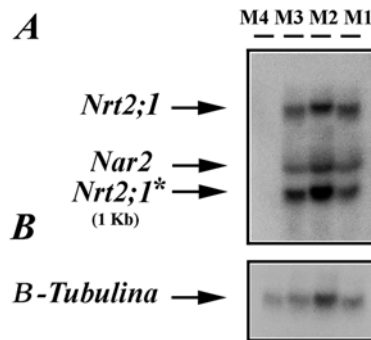


Fig.6. Expresión de los transcritos de *Nrt2;1* y *Nar2*. El RNA se obtuvo a partir de cultivos de células inducidas en nitrato 4 mM, durante 3 h. En A se hibridó con sondas específicas de *Nrt2;1* y *Nar2* (pB6a6) y en B con cDNA de la  $\beta$ -Tubulina. El transcrito de 1 Kb corresponde a un mRNA de *Nrt2;1* truncado como consecuencia de la integración del DNA que contenía los genes *Nrt2;1* y *Nrt2;2* por transformación en la estirpe parental 04-1.

La ausencia de proteína NiR en estos mutantes, se analizó a través de la técnica de inmunodetección en filtros de nitrocelulosa utilizando anticuerpos policlonales anti-fd-NiR de *C. reinhardtii*, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El anticuerpo reconoce específicamente a una proteína de 63 kDa que corresponde a la NiR (Pajuelo et al., 1993). Se

obtuvieron extractos crudos de las estirpes parentales (04-1 y G1), de los mutantes de NiR (M1, M2, M3 y M4) así como de otra estirpe mutante de NiR, F6 que tiene una reorganización génica en la región de la NiR (Quesada et al., 1993). Los extractos se prepararon a partir de células cultivadas en medios con amonio e inducidas en medios con nitrato 4 mM, durante 3 horas. En la figura 6, se puede comprobar que las estirpes M1, M2, M3, M4, G1 y F6 no dan inmunoprecipitado de NiR, mientras que si se pudo apreciar en la estirpe parental 04-1. Así pues, mediante esta estrategia se han obtenido dos tipos de mutantes de NiR, unos que portan los HANT (M1, M2, M3) y otros que carecen de ellos (M4).

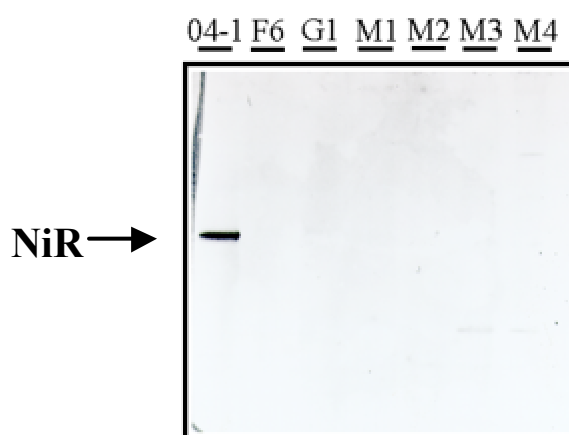


Fig.7. Análisis de inmunodetección de la expresión de la proteína fd-NiR. Los extractos crudos (50  $\mu$ g de proteína/calle) de las estirpes indicadas se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Otros detalles en el texto y Materiales y Métodos.

### Caracterización de las estirpes M1, M2, M3 y M4.

La actividad de HANT en las estirpes mutantes de NiR se determinó midiendo la desaparición de nitrato del medio cuando las células cultivadas en amonio, se transfirieron a medios que contenían nitrato 100  $\mu$ M. Como muestra la figura 8, después de un tiempo de inducción, las estirpes M1, M2 y M3 consumían nitrato eficientemente a la vez que excretaban nitrito al medio. En cambio, la estirpe M4 ni consumía nitrato ni excretaba nitrito. Como control, la estirpe silvestre 6145c consumía eficientemente nitrato pero no excretaba nitrito al medio.

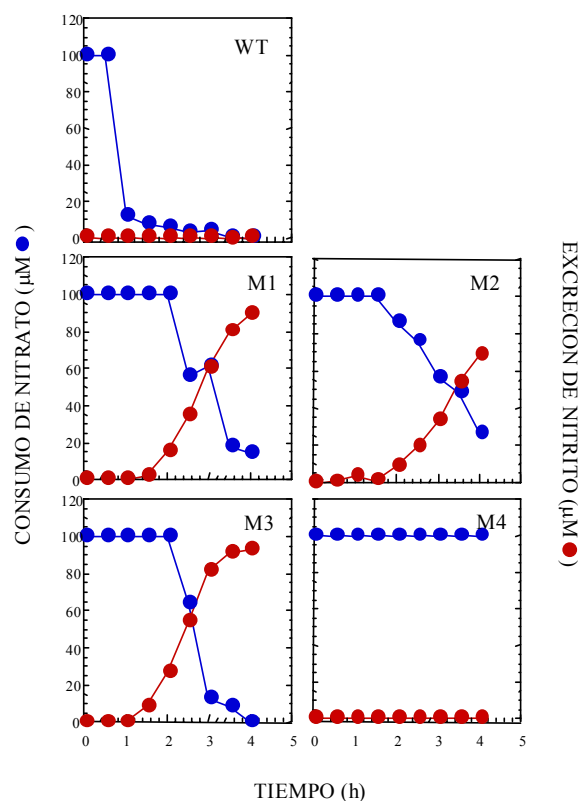


Fig.8. Actividad de consumo de nitrato y excreción de nitrito de las estirpes M1, M2, M3, M4 y WT (6145c) a partir de nitrato 100  $\mu\text{M}$ . Las células de las estirpes indicadas (150-250  $\mu\text{g}$  Chl/ml) cultivadas en 4 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se lavaron y se transfirieron a medios mínimo con 100  $\mu\text{M}$  de nitrato.

El consumo de nitrato a concentraciones micromolares, por los mutantes M1, M2 y M3 fue estequiométrico con la excreción de nitrito al medio, tal y como se deduce de los datos referentes al consumo de nitrato y excreción de nitrito que se muestran en la Tabla IV. Esta estequiometría de excreción de nitrito desde nitrato permitiría un estudio cinético indirecto de las características de los sistemas de transporte de nitrato, con una metodología más sencilla.

Tabla IV. Actividades de consumo de nitrato, excreción de nitrito y NiR en los mutantes de NiR y la estirpe silvestre 6145c. Las actividades de consumo de nitrato y excreción de nitrito se determinaron a partir de los datos en la Fig.8. \*La actividad NiR se determinó tras 3 h de inducción en medios con nitrato 4 mM

Estirpe	Actividad NiR (mU/mg Chl)	Consumo de Nitrato ( $\mu\text{mol/h/mg}$ Chl)	Excreción de Nitrito ( $\mu\text{mol/h/mg}$ Chl)
M1	0	1,9	2,1
M2	0	0,7	0,8
M3	0	2,4	2,4
M4	0	0	0
6145c	62	4	0

De manera generalizada se ha descrito la existencia de sistemas de transporte de nitrato de baja afinidad (Siddiqi et al., 1990; Tsay et al., 1993; Watt et al., 1992). Así pues, la existencia de este LANT en *C. reinhardtii*, se podría determinar en la estirpe M4, midiendo excreción de nitrito al medio a partir de nitrato milimolar. En la figura 9 se muestra que esta estirpe M4 comienza a excretar nitrito al medio a partir de concentraciones de nitrato 1 mM (Fig.9B) y significativamente a partir de nitrato 5 mM (Fig.9C) y 40 mM (Fig.9D). En ninguna de las estirpes y condiciones descritas se observó acumulación intracelular de nitrito. Estos datos indican la presencia en *C. reinhardtii* de sistemas de transporte, que son independientes de los HANT, y que permiten la entrada de nitrato con baja afinidad así como la salida eficiente del nitrito no asimilado.

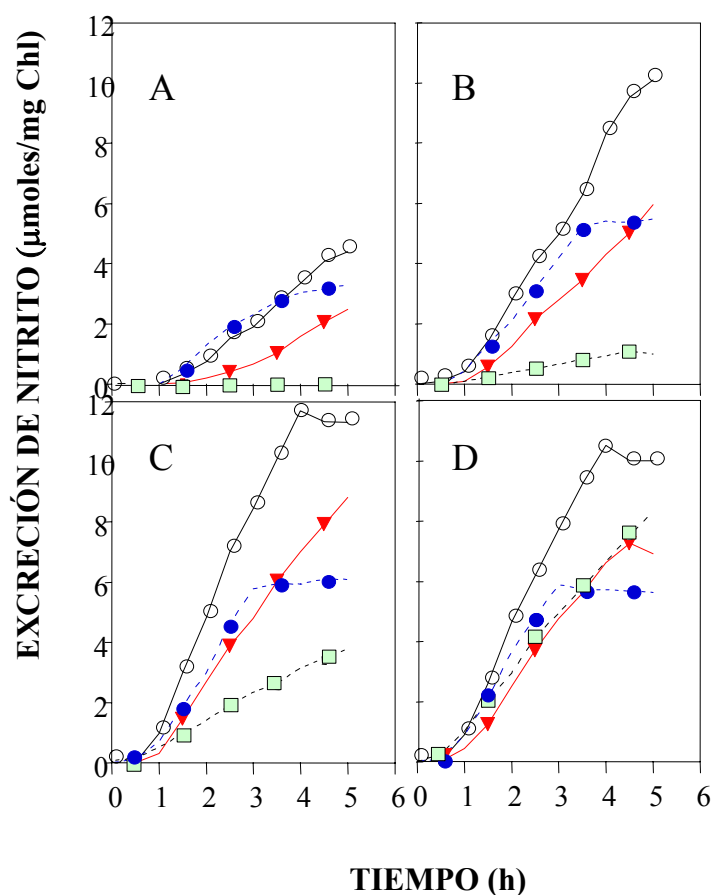


Fig.9. Actividad de excreción de nitrito en las estirpes M1, M2, M3 y M4 en medios con diferentes concentraciones de nitrato. Células de las estirpes M1(○), M2(▼), M3(●) y M4(◻), cultivadas en amonio, se transfirieron a medios con nitrato 0,1 mM (A), 1 mM (B), 5 mM (C) y 40 mM(D). Las actividades de excreción de nitrito se determinaron como se indica en Materiales y Métodos.



A continuación, se estudió el patrón de expresión de los HANT y NR, tanto en la expresión de los transcritos como de la actividad en los mutantes de NiR. Como controles se incluyeron la estirpe silvestre 6145c, y la estirpe mutante 305cw15 que carece de NR funcional y por ello presenta una desregulación de la ruta (Fernández y Cardenas, 1982; Galván et al., 1992). También como control del mutante de NiR M4, se incluyó la estirpe S10 cuya diferencia con la M4 es que S10 posee NiR funcional (Quesada et al., 1994).

La figura 10 muestra una cinética de inducción de la actividad BVH-NR en las estirpes silvestre, 305cw15 y M3 en medios sin nitrógeno y con nitrato 4 mM. En la estirpe 305cw15, era claro el patrón de desregulación, ya que mostraba valores altos de actividad NR y no necesitaba la señal de nitrato para su óptima expresión (Fig.10B). En cambio, la estirpe M3 al igual que la silvestre requería la señal de nitrato y no sobrexpresaba la actividad NR en medios sin nitrógeno (Fig.10C y A). Las otras estirpes M1, M2 y M4 tenían el mismo patrón de expresión de actividad BVH-NR que la estirpe M3 (Tabla V).

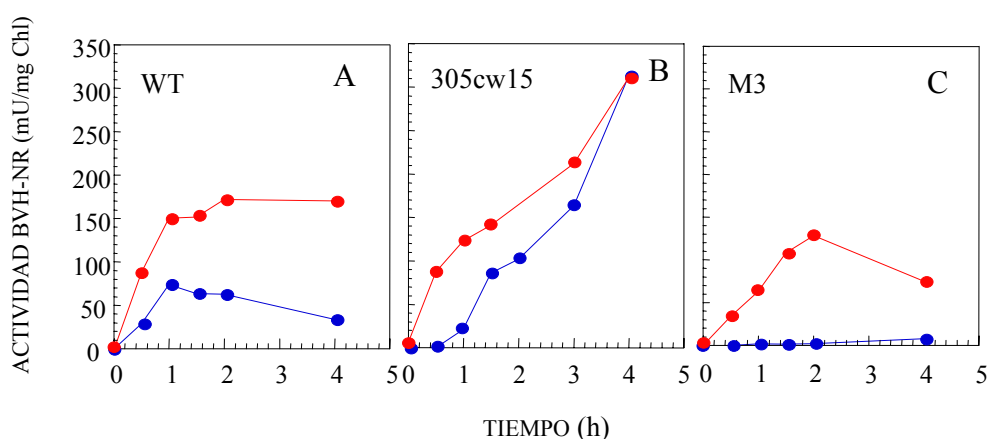


Fig.10. Expresión de la actividad BVH-NR en las estirpes silvestre (WT), 305cw15 y M3 en medios sin nitrógeno (●) o con nitrato 4 mM (●).

Los resultados de expresión de los transcritos de diversos genes para la asimilación de nitrato en los mutantes de NiR se muestran en la figura 11. Las células cultivadas en medios con amonio, se transfirieron a medios sin nitrógeno o con nitrato 0,1 mM durante 1,5 horas. Pasado este tiempo, se obtuvo RNA total. Tras la separación de los RNA por electroforesis y transferencia a filtros, éstos se hibridaron con sondas específicas de *Nial* y *Nrt2;2* (Fig.11A) o con sondas específicas de *Nrt2;1* y *Nar2* (Fig.11B). En medios sin

nitrógeno, sólo el mutante de NR 305cw15 sobreexpresó los transcritos de *Nia1*, *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2*. En las estirpes que tienen NR funcional (S10, M1, M2, M4 y WT), independientemente de que tuvieran o no NiR, la cantidad acumulada de mRNA de *Nia1* era inferior a la de la estirpe mutante 305cw15. Lo mismo ocurría para los mRNA de *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2*.

En medios con nitrato 0,1 mM, todas las estirpes mostraban unos niveles muy parecidos de mRNA de *Nia1* y significativamente inferiores a los de la estirpe 305cw15 en medios sin nitrógeno (Fig.11A). Es de resaltar que tanto la estirpe S10 como la M4, que carecen de HANT y en donde el nitrato no puede entrar eficientemente al interior celular, responden a esta señal de nitrato. De modo análogo a lo sucedido con *Nia1*, tampoco se observó sobreexpresión de los transcritos los HANT en los mutantes de NiR, M1 y M2, en medios sin nitrógeno (Fig.11B).

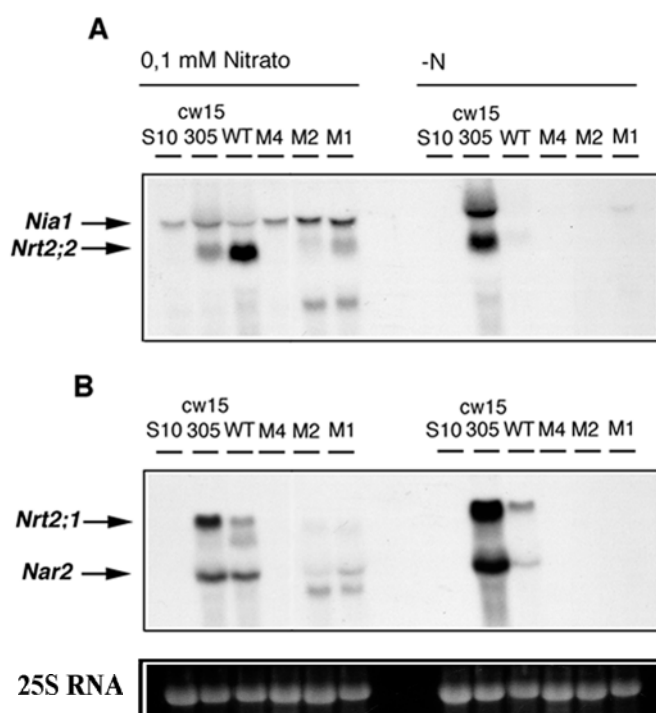


Fig.11. Expresión de los transcritos de *Nia1*, *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2* en los mutantes de NiR (M1, M2 y M4), mutante de NR (305 cw15), mutante de los sistemas de transporte de alta afinidad de NT (S10) y en la estirpe silvestre (WT), en medios carentes de fuente de nitrógeno o con 0,1 mM de nitrato.

A. Hibridación con las sondas de *Nia1* (B6a5.1) y cDNA de *Nrt2;2* de *C. reinhardtii*.

B. El mismo filtro empleado en A se reutilizó en la hibridación con las sondas correspondientes a los cDNAs de *Nrt2;1* y *Nar2* de *C. reinhardtii*.

En la tabla V se muestra los valores correspondientes a la expresión de la actividad BVH-NR en los mutantes de NiR, estirpe 305cw15 y tipo silvestre cultivados en amonio e incubados durante 3 horas en medios carentes de nitrógeno o con diferentes concentraciones de nitrato. La estirpe desregulada 305cw15, mostraba una alta actividad NR tanto en medios sin nitrógeno como con nitrato 0,1 mM o 4 mM. En medios sin nitrógeno, los mutantes de NiR expresaban cantidades insignificantes de actividad NR al igual que la estirpe S10, lo que está de acuerdo con las cantidades acumuladas de transcrito en esta condición. En medios con nitrato 0,1 mM, los mutantes de NiR M1, M2 y M3 inducían una actividad NR comparable a la de la estirpe silvestre. En cambio, las estirpes que carecían de los HANT M4 y S10, y a pesar de expresar el transcrito de *Nia1*, tenían actividades NR significativamente inferiores. Cuando en estas dos estirpes se forzaba la entrada de nitrato, en medios con nitrato 5 mM, la actividad NR aumentaba significativamente. Este dato sugiere un papel del nitrato a nivel postranscripcional regulando la NR.

Tabla V. Expresión de la actividad BVH-NR en las estirpes M1, M2, M3 y M4 en medios con diferentes concentraciones de nitrato. La actividad BVH-NR se determinó como se describe en Materiales y métodos en células cultivadas en amonio e inducidas durante 3 h en los medios indicados. Los datos representan la media de 4 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Estirpe	Actividad BVH-NR (mU/mg Chl)		
	-N	Nitrato 0,1 mM	Nitrato 5 mM
M1	4,25 $\pm$ 4,1	135 $\pm$ 57	170 $\pm$ 64
M2	1,25 $\pm$ 1,6	43 $\pm$ 28	140 $\pm$ 71
M3	5,96 $\pm$ 7	132 $\pm$ 52	185 $\pm$ 48
M4	2,25 $\pm$ 1,4	16 $\pm$ 6	180 $\pm$ 24
S10	3,95 $\pm$ 3,3	15 $\pm$ 7	83 $\pm$ 18
305 CW15	180 $\pm$ 59	303 $\pm$ 159	243 $\pm$ 48
6145c	68 $\pm$ 35	98 $\pm$ 38	167 $\pm$ 49

Puesto que en *C. reinhardtii* se han descrito mecanismos de regulación redox para la actividad NR, una posibilidad era que en medios con nitrato 0,1 mM, en donde se acumula cantidades importantes de transcrito de NR en las estirpes S10 y M4, la enzima estuviera inactiva. Sin embargo, como se muestra en la figura 12 tan sólo se apreció una muy escasa reactivación de la actividad NR por ferricianuro, en esta condición.

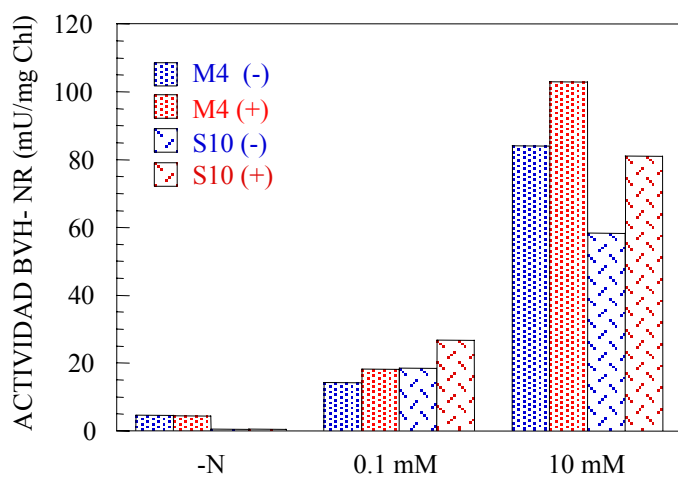


Fig.12. Actividad NADH-NR de las estirpes S10 y M4, en ausencia/presencia de ferricianuro. Se midió la actividad NADH-NR en las estirpes S10 y M4, en diferentes medios, en ausencia de nitrógeno y en medios con diferentes concentraciones de nitrato (0,1 y 10 mM) en ausencia/presencia de ferricianuro (60  $\mu$ M).

## DISCUSIÓN

En el alga verde unicelular *C. reinhardtii* se han aislado y caracterizado mutantes afectados en diferentes pasos de la asimilación de nitrato, pero hasta ahora no se habían estudiado mutantes afectados en la reducción de nitrito. En este trabajo se han construido dos tipos de mutantes de NiR. Aquellos que tienen NR y los sistemas de HANT (estirpes M1, M2 y M3) que serían mutantes sólo deficientes en la NiR, y el doble mutante de los HANT y de NiR (estirpe M4) (Figs.8, 9 y 11).

El análisis de la expresión de proteínas mediante Western en este trabajo, confirmó la ausencia de proteína NiR (Fig.7). Esto es debido a la ausencia del gen en la estirpe parental G1, en la que hay una deleción en la región genómica de *Nia1* que incluye al gen de la NiR y que ha segregado en los mutantes de NiR (Quesada et al., 1998a).

Estos mutantes de *C. reinhardtii*, al contrario de lo que ocurre con los de plantas superiores (Duncanson et al., 1993), no acumulaban nitrito intracelularmente, posiblemente por la ausencia de esta función en las vacuolas de *C. reinhardtii*. El hecho de que la excreción de nitrito al medio sea tan eficiente tanto en las estirpes que portan los HANT como la que no los portan, indica que existen transportadores eficientes en la membrana plasmática capaces de sacar eficientemente el nitrito de la célula y que son independientes de *Nrt2;1* y *Nar2*, el sistema de HANT biespecífico de nitrato/nitrito (Fig.9).

Puesto que estos mutantes no retienen nitrito dentro de la célula, son útiles para evaluar las actividades de los transportadores de nitrato de alta y baja afinidad, a través de la excreción de nitrito al medio a partir de nitrato (Fig.9). Así, se pudo comprobar las actividades de los HANT y LANT. El nitrato a concentraciones inferiores a 0,1 mM entraba eficientemente en la célula por los sistemas de HANT codificados por *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2* (Quesada et al., 1994; Galván et al., 1996), presentes en las estirpes M1, M2 y M3 (Figs.8 y 9). La entrada de nitrato en la estirpe M4 tenía lugar de modo significativo a concentraciones de nitrato de 10 a 50 veces mayores (Fig.9). Estos representarían los llamados LANT, entre los que serían candidatos los sistemas de transporte de nitrito de alta afinidad y/o posiblemente los sistemas de transporte de nitrito que operan a concentraciones limitantes de CO<sub>2</sub> (Rexach et al. 1998).

En ninguno de los mutantes de NiR se observó una desregulación en la expresión de NR o HANT, en el sentido de la sobreexpresión de dichos genes observada en la estirpe mutante de NR 305cw15 que no muestra requerimiento de nitrato para una expresión óptima (Fig.10, Tabla V; Fernández y Cárdenas, 1982; Galván et al., 1991). Los resultados apoyan que en *C.*

*reinhardtii*, la ausencia de metabolitos derivados de la asimilación de nitrato i.e., amonio o derivados del amonio, no es la causa de la desregulación observada en los mutantes de NR, sino que es algo inherente a la actividad NR y/o la proteína NR. Estos datos concuerdan con los obtenidos en *N. crassa* y *A. nidulans*, en donde mutantes de NiR no dan lugar a un patrón de desregulación (Hawker et al., 1992).

En el caso de plantas superiores, concretamente en cebada, espinaca y tabaco (Duncanson et al., 1993; Shiraishi et al., 1992; Vaucheret et al., 1992), el bloqueo de la asimilación de nitrato mediante estrategia antisentido (Vaucheret et al., 1992), en mutantes de NiR (Duncanson et al., 1993), o con inhibidores de la glutamina sintetasa (Shiraishi et al., 1992) da lugar a una sobreexpresión de los genes para la asimilación de nitrato. Se ha propuesto que es la glutamina el metabolito regulador ya que: 1) los niveles de glutamina, durante el ciclo circadiano, oscilan inversamente a los valores de NR (Deng et al., 1991). 2) la inhibición de la síntesis de glutamina mediante tratamiento con oinotricina, suprime la disminución de mRNA de NR en la fase inicial diurna (Deng et al., 1991) y 3) el tratamiento con glutamina da lugar a una disminución en los valores de apoproteína NR (Shiraishi et al., 1992).

En *C. reinhardtii*, el amonio y/o derivados del amonio dan lugar a una regulación negativa de la expresión de los genes para la asimilación de nitrato (Fernández et al., 1998), por tanto, se podría esperar que el bloqueo en la reducción de nitrato a amonio en los mutantes de NR y NiR, diera lugar a este patrón de desregulación, si éste fuera el factor regulador negativo predominante. Una interpretación que explicaría las diferencias en estos resultados podría ser el balance en la regulación de la NR por elementos reguladores positivos (i.e. nitrato) y negativos (amonio/derivados, ¿nitrito?). Nuestros resultados muestran que el nitrato micromolar es sentido en los mutantes de transporte M4 y S10 que expresan el transcrito de NR (Fig.11), pero también hace falta una señal intracelular de nitrato para la óptima expresión de la actividad NR (Fig.12 y Tabla V). Las señales positivas por trazas de nitrato, prevalecerían en el mutante 305cw15 en medios sin nitrógeno. En los mutantes de NiR, por el contrario prevalecería la señal de nitrito, generado de la reducción de nitrato. Puesto que el nitrito no se acumula intracelularmente y se excreta al medio, se podría generar una señalización diferente a la de plantas superiores.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN II:**

Construcción de vectores de expresión para la complementación de mutantes de *C. reinhardtii* con genes heterólogos de plantas

## RESULTADOS

### Complementación de mutantes de *C. reinhardtii* con genes heterólogos de plantas.

Como se ha indicado, el alga unicelular *C. reinhardtii* es un organismo modelo para el estudio de la asimilación de nitrato, y del que se dispone de una batería importante de mutantes afectados en diferentes pasos de la ruta de asimilación de nitrato (Fernández et al., 1998). Mediante la construcción de vectores de expresión que contengan genes heterólogos de plantas superiores, y la complementación de mutantes de *C. reinhardtii*, se pretendía poner a punto un sistema para determinar la funcionalidad de genes de plantas por complementación de dichos mutantes.

Entre los mutantes de *C. reinhardtii* que tienen interés para complementar con los genes de plantas están:

#### 1. Mutantes de los sistemas de HANT.

En plantas se han clonado genes pertenecientes a la familia *Nrt2*, que muestran homología con los genes *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nrt2;3* de *C. reinhardtii* (Quesada et al., 1994; Quesada et al., 1997; Quesada et al., 1998b; Trueman et al., 1996). En *C. reinhardtii* dichos transportadores tienen una funcionalidad específica: *Nrt2;1* es un componente de un sistema biespecífico de nitrato/nitrito; *Nrt2;2* es específico de nitrato (Galván et al., 1996) y *Nrt2;3* recientemente clonado, posiblemente sea específico del transporte de nitrito (Quesada et al., 1998b; Rexach et al., 1998). Sin embargo, se desconoce la funcionalidad/especificidad de los genes homólogos de esta familia *Nrt2* en plantas.

#### 2. Mutantes afectados en el gen *Nit2*.

*Nit2* codifica para el único elemento regulador positivo de la asimilación de nitrato descrito en eucariotas fotosintéticos (Schnell et al., 1993). Actualmente, no se han descrito en plantas superiores ningún gen homólogo.

#### 3. Mutantes afectados en los genes *Nrg1* y *Nrg2*.

*Nrg1* y *Nrg2* son genes reguladores negativos de la asimilación de nitrato (Prieto et al., 1996). En la actualidad, tampoco se han descrito mutantes de este tipo en plantas.

Para poner a punto este sistema de complementación con genes heterólogos, se han construido diversos vectores de expresión que contenían cDNAs de plantas: i) *Bch1* (cebada) que presenta homología con *Nrt2;1* de *C. reinhardtii* (Trueman et al., 1996) y NR (tabaco) (Vauchert et al., 1989), bajo el control del promotor de *C. reinhardtii* *RbcS2* (Goldschmidt-



Resultados I I: Construcción de vectores de expresión para la complementación de mutantes de *C. reinhardtii* con genes heterólogos de plantas

Clermont y Rahire, 1986) en los que se ha introducido la secuencia de la zona terminal 3' del gen de la NR de *C. reinhardtii*. Esta construcción ha sido denominada vector receptor.

En la construcción de este receptor común, la zona promotora del gen de la Rubisco (*RbcS2*) fue amplificada por PCR utilizando como DNA molde, DNA plasmídico que contiene la región genómica de *RbcS2* a amplificar (Goldschmidt-Clermont y Rahire, 1986), y como cebadores específicos las secuencias de nucleótidos 5up*RbcS2* y 3lo*RbcS2* que corresponden a las posiciones -1103 y +29 de la secuencia genómica de *RbcS2*:

5up*RbcS2*: 5' CCA AGC TTT GTG CGT TCA GTC CT 3'

3lo*RbcS2*: 5' TTA AGC TTT TGA GTG ACT TCT CT 5'

La temperatura óptima de alineamiento para estos cebadores fue de 55°C. La amplificación del DNA por acción de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer Cetus) durante 30 ciclos (94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg; 72°C, 1 min) y 1 ciclo (94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg; 72°C, 8 min) en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

El producto de PCR resultante (1,1 Kb) fue digerido con la enzima de restricción HindIII, clonado en el plásmido pUC119 y comprobada su orientación correcta. El DNA resultante de esta ligación se digirió con las enzimas BamHI y EcoRI. El DNA correspondiente a la región terminadora de la NR contenido en el plásmido pMN24 fue digerido con las restrictasas BamHI y EcoRI (1,5 Kb). El producto de ligación de ambos productos constituye el vector receptor utilizado, teniendo los sitios de clonación para las restrictasas SphI, PstI, Sall y XbaI de la zona de clonación múltiple del plásmido (Fig.13).

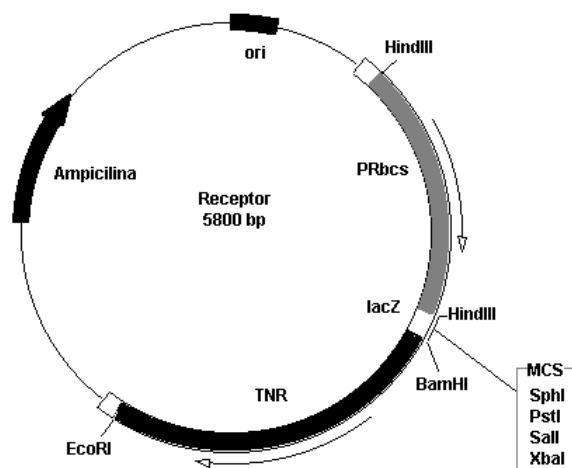


Fig.13. Construcción del vector de expresión receptor.

### **Construcción de un vector de expresión del gen *Bch1* de cebada en *C. reinhardtii*.**

Para la construcción de los vectores de expresión del gen *Bch1* de cebada (Trueman et al., 1996), el cDNA correspondiente al gen *Bch1* clonado en el plásmido pBch1 en pBSK (1,8 Kb) se liberó por digestión con las relictasas *SmaI* y *HindIII*. El producto de digestión se trató con Klenow polimerasa para generar extremos romos o no cohesivos y de igual forma el receptor digerido con *Sall*, que posteriormente se ligaron.

### **Construcción de un vector de expresión de la NR de tabaco en *C. reinhardtii*.**

La construcción de los vectores de expresión de la NR de tabaco se llevó a cabo mediante dos estrategias:

a. El cDNA de la NR de tabaco (NR2) contenido en el plásmido pCSL16 (Vaucherte et al., 1989) (Fig.14) se amplificó por PCR obteniéndose un inserto de aproximadamente 2,8 Kb, utilizando cebadores específicos de los extremos 5' y 3' no traducidos, creándose sitios de corte *Sall* en ambos extremos del cDNA.

upTNR1-3: 5' TCA GTC GAC ATT CAT ATT CTT 3'

loTNR2-4: 5' TAC AAT GTC GAC AAC TGA TAG 3'

La amplificación del DNA por acción de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer Cetus) durante 30 ciclos (94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg; 72°C, 1 min) y 1 ciclo (94°C, 30 seg; 55°C, 40 seg; 72°C, 8 min). La temperatura óptima de alineamiento para estos cebadores fue de 55°C.

El producto de PCR se digirió con *Sall* al igual que el receptor, que posteriormente se ligaron. Para comprobar la orientación correcta del inserto, el producto de la ligación se digirió con la enzima *SphI*. El cDNA posee un sitio interno de corte en la posición 2089, por lo que si el inserto estuviera orientado correctamente se liberaría en el producto de digestión un inserto de 0,8 Kb aproximadamente. Esta construcción la designamos como pRbcS2-NR<sub>Nic1</sub>.

b. Es posible que se produzcan mutaciones en la amplificación del cDNA por acción de la polimerasa, por ello se ideó otra estrategia en donde se obtenía el cDNA de tabaco por digestión con las relictasas *SstI* y *PstI* del plásmido pCSL16, liberando un inserto de 2,8 Kb. El producto de digestión se trató con Klenow DNA polimerasa para generar extremos romos o no cohesivos y de igual forma el receptor digerido con *Sall*, que posteriormente se ligaron. Esta construcción se ha nombrado pRbcS2-NR<sub>Nic2</sub>.

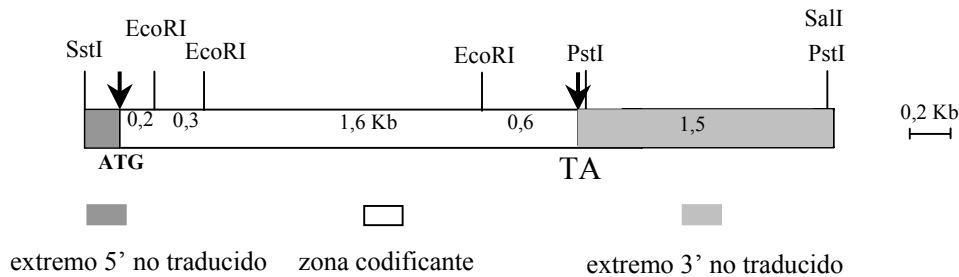


Fig.14. Plásmido pCSL16 linealizado que contiene la NR de tabaco (Adaptado de Vaucheret et al., 1989).

### **Construcción de un vector de expresión de la NiR de espinacas en *C. reinhardtii*.**

El vector de expresión para la NiR de espinacas bajo el promotor del gen de la Rubisco (*Rbcs2*) de *C. reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont y Rahire, 1986) se ha construido de la siguiente forma: el DNA que contiene el promotor de *Rbcs2* y el péptido señal de rubisco para su transporte al cloroplasto, fue amplificado por PCR introduciendo mediante dos cebadores específicos (-1103, +188) dos sitios de restricción (HindIII y BamHI) en los extremos 5' y 3'.



Las condiciones óptimas para la reacción de la polimerasa fueron: 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50-100 pmol de cebador, 50 ng de DNA genómico, 1x tampón de la polimerasa. La temperatura óptima de alineamiento de secuencias se estimó en 62°C y las condiciones establecidas para el termociclador (PTC-100<sup>TM</sup>, Pertier-Effect Cycling, MJ. Resarch, Inc.) fueron de 30 ciclos (96°C 1 min, 62°C 30 seg, 72°C 1 min) y 1 ciclo (96°C 1 min, 62°C 30 seg, 72°C 8 min). El fragmento de 1270 pares de bases amplificado y purificado a partir de geles de agarosa (según lo descrito en Materiales y Métodos) fue digerido con las enzimas de restricción HindIII y BamHI para generar los sitios de corte en las moléculas de DNA y poder clonarlo en el plásmido pUC 119.

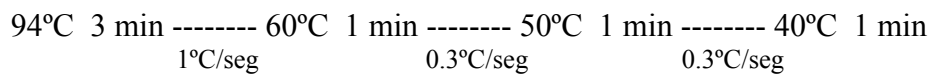
El DNA copia de la NiR de espinacas pCIB400 (Back et al., 1988) digerido con las restrictasas SacII y EcoRI (1900 pb) se unió a una secuencia de oligonucleótidos para permitir

Resultados I I: Construcción de vectores de expresión para la complementación de mutantes de *C. reinhardtii* con genes heterólogos de plantas

la lectura en fase de la secuencia de DNA de la NiR en un plásmido pUC119 (BamHI y EcoRI). Este adaptador fue sintetizado por alineamiento de dos cebadores Sp5 y Sp3 que originan la aparición de los sitios de restricción BamHI y SacII.



Se mantuvo una relación equimolecular en la ligación de los cebadores y el cDNA de espinacas contenido en el plásmido pCIB400, teniendo en cuenta el modo en que afecta el tamaño (pb) al número de moléculas de DNA (pCIB/Sp5 = 63,3, pCIB/Sp3 = 79,16 y Sp5/Sp3 =1,25). En función de estas relaciones, se realizó el alineamiento de las dos cadenas del adaptador en un termociclador, donde las condiciones fueron:



Finalmente la construcción del vector de expresión se llevó a cabo mediante la ligación de los productos de la digestión con las enzimas BamHI y EcoRI de los plásmidos que contenían el promotor de *Rbcs2* clonado en pUC 119 (HindIII y BamHI) y la unión del adaptador a pCIB400 clonado en pUC119 (BamHI y EcoRI).

La comprobación de que el promotor había entrado en fase con la NiR (pRbcS2-NiR<sub>Esp</sub>) a través del adaptador se realizó a través de reacciones de secuenciación con los cebadores universales forward y reverse, en un secuenciador automático (ABI-310 Perkin Elmer).

### **Estudios de complementación.**

En la Tabla VI se indica las estirpes mutantes de *C. reinhardtii* que han sido transformadas con los genes homólogos y con las construcciones realizadas para la expresión de genes heterólogos de plantas, así como la eficiencia obtenida en estas transformaciones.

Tabla VI. Estudios de complementación de mutantes de *C. reinhardtii* mediante transformación y su eficiencia. Las transformaciones se llevaron a cabo según lo descrito en Materiales y Métodos. El plásmido pCo5T2 porta los genes *Nrt2;1* y *Nar2* de *C. reinhardtii*; pMN24 el gen *Nial* y pNii1 el gen de la NiR.

Estirpe	Plásmidos utilizados en la transformación	Eficiencia transformación
S10	pCo5T2	2-60
	pRbcS2-Bch1	0
	pRbcS2-Bch1 + pB6a	0
305cw15	pMN24	50-300
	pRbcS2-NR <sub>Nic2</sub>	2 ?
P4	pMN24	2-25
	pRbcS2-NR <sub>Nic2</sub>	0
M2	pNii1	2
	pRbcS2-Nii1 <sub>esp</sub>	0

### 1. Complementación de la estirpe S10 HANT<sup>-</sup> de *C. reinhardtii*.

La estirpe S10 es un mutante de delección de los sistemas HANT, que requieren para su complementación y crecimiento en nitrato la introducción de al menos dos genes *Nrt2;1* y *Nar2* o *Nrt2;2* y *Nar2* de *C. reinhardtii* (Quesada et al., 1994). La transformación con estos genes contenidos en el mismo plásmido (pCo5T2) tiene una eficiencia de transformación que oscila entre 2-60 transformantes por transformación. Esta eficiencia disminuye si los dos genes proceden de plásmidos diferentes (Quesada et al., 1994).

Repetidas transformaciones con los vectores que contenían el gen de cebada *Bch1* (pRbcS2-Bch1), no dieron resultados positivos. Puesto que los HANT requieren la funcionalidad de la proteína *Nar2*, se realizaron co-transformaciones con DNA de los genes *Bch1* y *Nar2*, contenidos en los plásmidos pBch1 y pB6a, aunque tampoco se obtuvieron resultados positivos.

Las transformaciones se realizaron según lo descrito en Materiales y Métodos.

## **2. Complementación de mutantes de NR.**

La estirpe 305cw15 fue transformada con la construcción de NR resultante de la estrategia **b** (pRbcS2-NR<sub>Nic2</sub>). Se obtuvieron dos hipotéticos transformantes Nit<sup>+</sup> (pRbcS2-NR15 y pRbcS2-NR8,16). Estas estirpes fueron analizadas mediante amplificación de DNA por PCR con los cebadores específicos de *RbcS2*: 5up*RbcS2* y 3lo*RbcS2* en las condiciones descritas anteriormente, con resultado negativo. También se analizó la actividad BVH-NR en medios con amonio, con resultado negativo.

En este caso, no se podía descartar la posibilidad de reversión ni una complementación intergénica. Por ello se transformó el mutante de delección de NR, P4. Esta es una estirpe que poseía pared celular, a diferencia del 305cw15, por lo que la eficiencia de transformación con el gen homólogo pMN24 (Fernández et al., 1989) disminuyó considerablemente, y tampoco se obtuvieron resultados positivos de complementación con el gen heterólogo.

## **3. Complementación de mutantes de NiR de *C. reinhardtii*.**

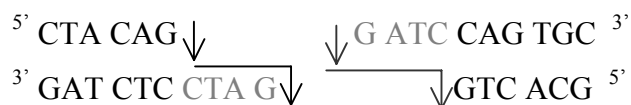
La construcción de mutantes de NiR además de ser una arma útil en la obtención de información para un mejor entendimiento de la ruta de asimilación de nitrato, nos permite la posibilidad de complementación con genes homólogos y heterólogos de NiR. Así, el mutante de NiR M2 ha sido complementado recientemente con el propio gen de la NiR de *C. reinhardtii* (Quesada et al, 1998a). Para comprobar la expresión funcional de la NiR de espinacas bajo el control del promotor del gen de *Rubisco*, se transformaron células de la estirpe M2 con el plásmido pRbcS2-NiR<sub>Esp</sub> usando medios selectivos con nitrato (4 mM) o nitrito (1,5-2 mM), aunque sin resultado positivo.

Con objeto de demostrar la funcionalidad de la NiR expresada desde el cDNA de NiR de espinacas, se procedió a la expresión en *E. coli* fusionándolo con el gen de la  $\beta$ -Galactosidasa tal y como se describió previamente (Bellissimo et al., 1995). El plásmido que contiene el cDNA de la NiR unido al adaptador se digirió con la restrictasa BamHI que lo linealiza, posteriormente una parte pequeña del volumen de digestión se trató con la nucleasa S1 que digiere únicamente DNA de simple cadena de los extremos protuberantes originando extremos romos o no cohesivos que entran en fase con la secuencia de la  $\beta$ -Galactosidasa en el plásmido.

Resultados I I: Construcción de vectores de expresión para la complementación de mutantes de *C. reinhardtii* con genes heterólogos de plantas

pUC 119

ADAPTADOR---cDNA *NiR*



Después del tratamiento con la nucleasa, el DNA se recircularizó por acción de una ligasa y se comprobó que no se digería con la enzima BamHI. Se seleccionaron las colonias S3-1 y S4-1 que se cultivaron durante toda la noche. Posteriormente se incubaron en medios que contenían 0,5 mM de IPTG o 0,5% de glucosa en presencia continuada de 0,1 mg/ml de ampicilina en el medio hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, que correspondió a un valor de  $A_{595}$  de 0,45-0,55. En la Tabla VII se observa la medida de la actividad NiR realizada a partir de los extractos crudos de las células de *E. coli* que muestra una correcta expresión de actividad inducible por la presencia de IPTG en el medio y reprimible por glucosa donde se detectó una actividad basal.

Tabla VII. Actividad NiR de espinacas expresada en *E. coli*. La actividad NiR se midió como se describe en Materiales y Métodos a partir de los extractos crudos de las células S3-1 y S4-1 inducidas en medio LB con 0,5 mM de IPTG (I) o 0,5% de glucosa (G).

Estirpe	Condición	Actividad NiR (mU/mg Prot)
S3-1	IPTG	186,3
S3-1	Glucosa	55
S4-1	IPTG	143,7
S4-1	Glucosa	6

Los mutantes de NiR (M1, M2 y M3) han sido transformados con la construcción pRbcS2-NiR utilizando medios selectivos con nitrato 4 mM y nitrito 2 mM como fuente de nitrógeno, sin resultados positivos. Igualmente se utilizó la doble estirpe mutante de NiR y NT (M4), al considerar que en medios con nitrato, los mutantes M1, M2 y M3 pudieran generar demasiado nitrito y fuera tóxico para las células, aunque tampoco se obtuvieron resultados positivos.

## DISCUSIÓN II

Como se ha mencionado anteriormente las características genéticas y fisiológicas del alga eucariota unicelular *C. reinhardtii*, le muestran como un organismo modelo de resultados extrapolables a plantas. Debido a la dificultad que conlleva la obtención de transformantes estables que hayan integrado copias de DNA exógeno funcionales en su genoma, se han desarrollado diversos sistemas de transformación nuclear enfocados a la obtención de transformantes que expresen genes heterólogos. En este organismo, se han obtenido transformantes con la construcción quimérica *CabII-1/ GUS* para la expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el promotor *CabII-1*, donde se observó que en transformantes donde se había integrado intacto el gen quimérico, éste no se expresaba y mostraron una hipermetilación en la región promotora del *CabII-1* (Blankenship y Kindle, 1992). Esto parecía sugerir que el DNA de los genes heterólogos es reconocido por el alga, y silenciados a través de mecanismos celulares relacionados con la acción de metilasas (Blankenship y Kindle, 1992). En vertebrados y plantas el silenciamiento génico se ha relacionado con las metilaciones en la posición 5' de los residuos de citosina en el DNA (Bestor, 1998). Estudios recientes han descrito la existencia de una proteína (MeCP2) que se une selectivamente a DNA metilado y que existe como un complejo con histonas desacetilasas (Nan et al., 1998). Estos resultados indican que la desacetilación de las histonas está guiada a dominios cromatínicos específicos a través de mecanismos de metilación (Bestor, 1998).

Recientemente se han obtenido transformantes estables en el genoma nuclear de *C. reinhardtii* de un gen quimérico que contiene la secuencia codificante del gen *Ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* fusionado a la región no traducida 5' y 3' del gen nuclear *RbcS2* que confiere resistencia al antibiótico Fleomicina/Bleomicina (Stevens et al., 1996). Este gen (*Ble*) es apropiado debido a que el uso de codones es muy parecido al de *C. reinhardtii* (Stevens et al., 1996).

Se han propuesto diversos mecanismos que tratan de explicar la dificultad de obtención de transformantes con DNA exógeno: 1. El silenciamiento por metilación (Blankenship y Kindle, 1992; Nan et al., 1998); 2. El uso inapropiado de codones en el gen heterólogo con respecto al de *C. reinhardtii* (Rochaix et al., 1987); 3. La pérdida de intrones y otros elementos no codificantes pero determinantes en la expresión (Stevens y Purton, 1994); 4. Posible papel regulador de dominios heterocromáticos/cromosómicos en la inactivación



transcripcional (Cerutti et al., 1997). Este mecanismo de inactivación, mediante supresión transcripcional era independiente de metilaciones del DNA integrado.

Estos mecanismos podrían explicar la elevada dificultad de obtener transformantes en *C. reinhardtii* con genes heterólogos. En nuestro caso no se puede descartar por completo la posibilidad de error en las construcciones (mutaciones debidas a la amplificación de la polimerasa), aunque este no sea el caso de aquellas empleadas en la complementación de los mutantes de NiR, ya que el DNA de la zona promotora fue comprobado mediante secuenciación automática. La complementación con la construcción con *Bch1* era un reto más difícil por varios motivos. Como se ha demostrado en *C. reinhardtii*, se necesita la interacción de dos componentes (*Nrt2;1* y *Nar2* ó *Nrt2;2* y *Nar2*) para un eficiente transporte de nitrato de alta afinidad. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual esta interacción se lleva esto a cabo, es posible que dicha interacción entre las proteínas de diferente origen (del gen heterólogo *Bch1* y *Nar2*) no sea eficiente. Otra posibilidad es que dada la existencia de otros componentes de la familia de *Nrt2* relacionados con sistemas de transporte de nitrito (*Nrt2;3*), y dado que no se conoce la funcionalidad de *Bch1*, podríamos estar transformando una estirpe en la que ese sistema de transporte ya esté representado y, así no pudiésemos complementar algo ya funcional.

En los estudios de complementación de los diversos mutantes hemos tenido el problema adicional de una baja eficiencia de transformación. Esta eficiencia depende de diversos factores, entre los que se encuentran las características genéticas de las estirpes, de la ausencia/presencia de pared celular así como del marcador utilizado. En *C. reinhardtii* ha sido descrito recientemente un método de transformación con una alta eficiencia mediante electroporación, y que podremos utilizar inmediatamente (Shimogawara et al., 1998). Es posible que un rendimiento bajo en las transformaciones sea un problema añadido a una baja expresión de los genes heterólogos, por lo que en un futuro se podría repetir las transformaciones intentando mejorar el rendimiento mediante esta técnica mejorada.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN III:**

Estudio de estirpes de *C. reinhardtii* que expresan la NR constitutiva

## RESULTADOS III

### Expresión de los HANT y de la NR en la estirpe Tx11-8.

En las estirpes silvestres de *C. reinhardtii*, la expresión de los HANT y HANiT se reprime por amonio y se induce óptimamente en medios con nitrato (Galván et al., 1991; Quesada y Fernández, 1994). Además, cuando se añade amonio a células que están consumiendo nitrato o nitrito, se produce un bloqueo total de dichas actividades (Florencio y Vega, 1983; Galván et al., 1996). La estirpe Tx11-8 es una estirpe 305cw15 que ha sido transformada con el gen *Nia1* bajo control del promotor del gen *CabII-1* que codifica para una proteína de unión de clorofila a/b en el fotosistema II (Blankenship y Kindle, 1992). Esta estirpe transgénica, Tx11-8 muestra las siguientes características (Prieto, 1993):

1. Crece en medios con nitrato.
2. Muestra un fenotipo de CSA.
3. Expresa de forma constitutiva el mRNA de *Nia1* en medios con amonio, pero la actividad NR es prácticamente indetectable.
4. La proteína NR se sintetiza de forma inactiva y se reactiva *in vitro* mediante tratamiento con ferricianuro, o *in vivo* por la presencia de nitrato en el medio.

Este primer estudio llevó a proponer que en *C. reinhardtii*, el nitrato también regula la NR postranscripcionalmente, y que la NR tiene un papel regulador sobre otros genes de la asimilación de nitrato. De modo que, la expresión de NR de forma constitutiva da lugar a una desregulación permitiendo la expresión de los transportadores de nitrato en medios con amonio. Con el objeto de comprobar estas hipótesis, y de determinar qué transportadores y cómo se desregula/regula la actividad de estos transportadores por el simple hecho de tener una NR constitutiva, se ha llevado a cabo un estudio más detallado de ésta y otras estirpes que portan el gen quimérico *CabII-1-Nia1*.

Puesto que únicamente los HANT son los responsables del transporte de nitrato a concentraciones micromolares (Quesada et al., 1994; Galván et al., 1996), hemos comprobado si estos sistemas pueden dar cuenta del transporte de nitrato observado en esta estirpe Tx11-8 en presencia de amonio. Como se muestra en la figura 15, se detectó una pequeña actividad de excreción de nitrito ( $1,3-3,1 \text{ nmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}$ ) hasta 4 h después de transferir las células de la estirpe Tx11-8 procedentes de un cultivo de amonio a un medio que contenía 2

mM de amonio y 100  $\mu$ M de nitrato. Finalmente, el nitrito se consumió rápidamente pasadas las cuatro horas, probablemente por inducción de la NiR. Esta mínima actividad de transporte de nitrato, no era detectada por HPLC de modo significativo. Este experimento se realizó paralelamente con una estirpe silvestre donde no se detectó la expresión de actividades NR, NiR y de excreción de nitrito en las mismas condiciones.

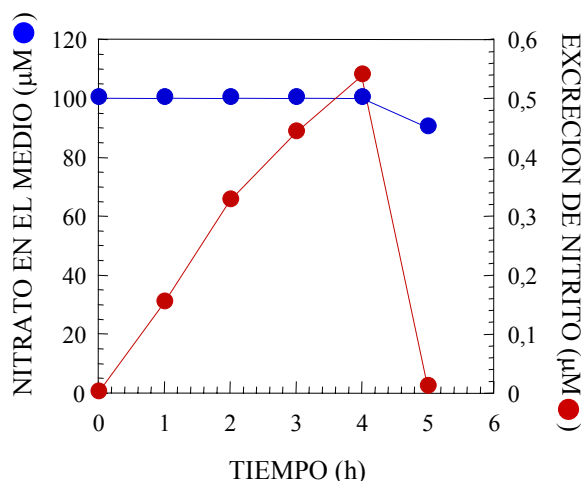


Fig.15. Excreción de nitrito en la estirpe Tx11-8 a partir de nitrato 100  $\mu$ M en presencia de amonio. Las células de la estirpe Tx11-8 se cultivaron en medios con amonio y se transfirieron a medios con nitrato 100  $\mu$ M y amonio 2 mM. A los tiempos indicados se tomaron muestras para la determinación de nitrato (●) y nitrito (●) en el medio.

La expresión de los transcritos de *Nia1* y los HANT (*Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2*) se ha estudiado comparativamente en la estirpe Tx11-8 y la estirpe parental 305cw15 (Fig.16). Se aisló RNA total a partir de cultivos celulares en diferentes condiciones: i) células cultivadas en amonio en luz continua, ii) células cultivadas en amonio y sometidas a un tratamiento de oscuridad de 16 horas, iii) células de amonio adaptadas a la oscuridad y transferidas a la luz durante 3 h en presencia de nitrato. Como muestra la figura 16A, la expresión del gen quimérico CabII-1-*Nia1* responde a la señal de luz (Blankeship y Kindle, 1992), mientras que la expresión del gen endógeno *Nia1* responde a la señal de nitrato. En medios con amonio, ni la estirpe parental 305cw15 ni la Tx11-8 expresaron cantidades significativas de los transcritos de *Nar2* (Fig.16B) ni de *Nrt2;1* (Fig.16C). En esta figura es de resaltar que en luz continua y tras la inducción con nitrato, la cantidad de transcritos de *Nar2* y *Nrt2;1* era insignificante en comparación con la estirpe parental 305cw15. Sin embargo, tras un periodo

de oscuridad de 16 horas, para evitar la expresión del gen quimérico *CabII-1-Nia1*, la cantidad de los transcritos de *Nar2* y *Nrt2;1* eran comparables a los detectados en la estirpe 305cw15 (Figs.16B y C).

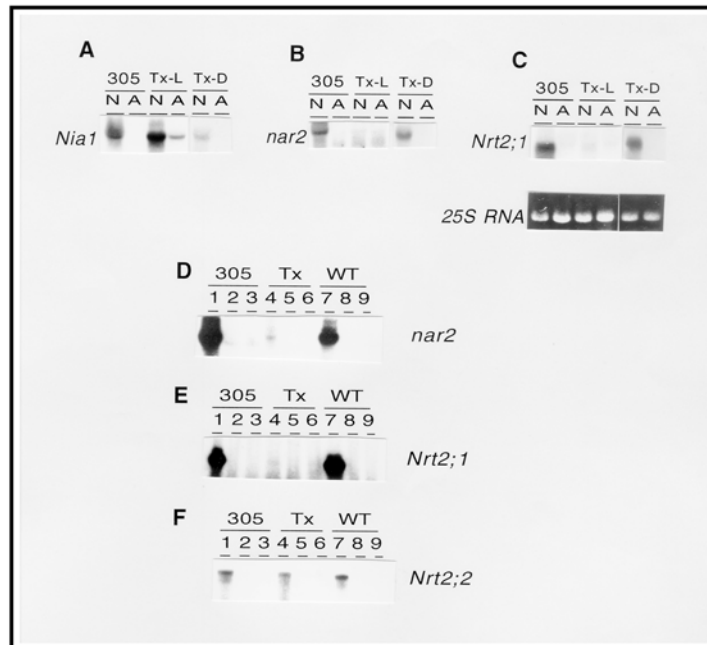


Fig.16. Expresión de los transcritos de *Nia1*, *Nar2*, *Nrt2;1* y *Nrt2;2* en las estirpes silvestre, 305cw15 y Tx11-8 en diferentes medios. (A-C) EL RNA de las estirpes 305cw15 y Tx11-8 (Tx-L) fue aislado a partir de células cultivadas en medios con amonio en condiciones de luz continua (A), e inducidas durante 3 h en un medio con nitrato 4 mM (N) hibridándose con las sondas homólogas (*Nia1*) pB6a-2, (*Nar2*) pB6a-4 y (*Nrt2;1*) pB6a-6. Se utilizaron las mismas sondas específicas en la hibridación del RNA de la estirpe Tx11-8 sometida a un tratamiento de 16 h de oscuridad (Tx-D) en medios con amonio (A) e inducidas en nitrato durante 3 h (N). La cantidad de transcrito se comparó en relación al RNA ribosómico 25S. (D-F) Mediante la técnica de protección de RNasas, se hibridó RNA aislado de células de las estirpes 305cw15, Tx11-8 y WT en medios con amonio (2, 5 y 8), nitrato amónico (3, 6 y 9) o nitrato (1, 4 y 7), con sondas específicas para *Nar2*, *Nrt2;1* y *Nrt2;2*, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Para aumentar la sensibilidad en la detección de los transcritos de los HANT, y poder explicar la actividad de transporte de nitrato en medios con amonio, se ha utilizado la técnica de protección de ribonucleasas (Fig.16 D, E y F). El RNA total se hibridó con sondas de RNA específicas para los genes *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2* marcadas radiactivamente (ver Materiales y Métodos). En este caso se obtuvieron resultados similares. En luz continua y en

medios con amonio, en la estirpe Tx11-8 no se detectaban los transcritos de *Nar2* (Fig.16D), *Nrt2;1* (Fig.16E) ni *Nrt2;2* (Fig.16F). Además, se confirmaba que la abundancia de estos transcritos en luz continua y después de la inducción en medios con nitrato, era más reducida en la estirpe Tx11-8 que en las respectivas estirpes controles 305cw15 y silvestre. Estos resultados sugieren que la presencia del gen quimérico *CabII-1-Nia1* altera la expresión de los genes *Nrt2;1* y *Nar2*, y parcialmente la de *Nrt2;2*, de manera que no responde totalmente a la inducción por nitrato.

A continuación, para explicar los resultados anteriores de baja expresión de los transcritos de los HANT en células cultivadas con luz continua y en presencia de nitrato, se hizo el siguiente planteamiento experimental. La expresión del gen *CabII-1-Nia1* está regulada por la luz independientemente de la presencia de amonio en el medio. Así pues, los cultivos celulares de la estirpe Tx11-8 procedentes de medios con amonio se dividieron en dos, uno se mantuvo en luz continua mientras que el otro se pasó a oscuridad durante 16 h, de modo similar al experimento de la figura 16. Pasado este tiempo, las células se lavaron para eliminar el amonio, se transfirieron a medios que contenían nitrato 4 mM a la luz y se tomaron muestras a intervalos de 1 h durante 6 h, aislándose RNA para su posterior análisis en Northern. Como se aprecia en la figura 17A, a tiempo inicial y en células que proceden de oscuridad no se detectó el transcrito de *CabII-1-Nia1*, a diferencia de las que fueron cultivadas con luz continua (Fig.17B). La expresión del mRNA de *Nia1* en medios con nitrato (*CabII-1-Nia1* más el endógeno) se indujo fundamentalmente a partir de la primera hora manteniéndose el transcrito acumulado en valores altos posteriormente, al igual que sucedía en las células cultivadas en luz continua donde estas cantidades de mRNA de *Nia1* eran sensiblemente inferiores. En células que procedían de la oscuridad, la expresión de los transcritos de los HANT tuvo un patrón de expresión similar al de la estirpe parental 305-CW15 (Figs.16, 17A y C).

Sin embargo, en las células cultivadas en luz continua el patrón de expresión fue totalmente diferente. La acumulación del transcrito del gen *Nrt2;1* presentó un máximo a la hora que se mantuvo hasta las dos horas, pasado este tiempo las cantidades del transcrito descendieron hasta unos valores muy reducidos. Los genes *Nar2* y *Nrt2;2* presentaban también unos valores de expresión muy bajos en todos los puntos de la cinética analizados (Fig.17B y D).

La diferencia en el patrón de expresión en los genes para la asimilación de nitrato entre las células cultivadas en luz continua y las células procedentes de la oscuridad apoyan una vez más el papel autoregulador de la NR y de ésta sobre los HANT.

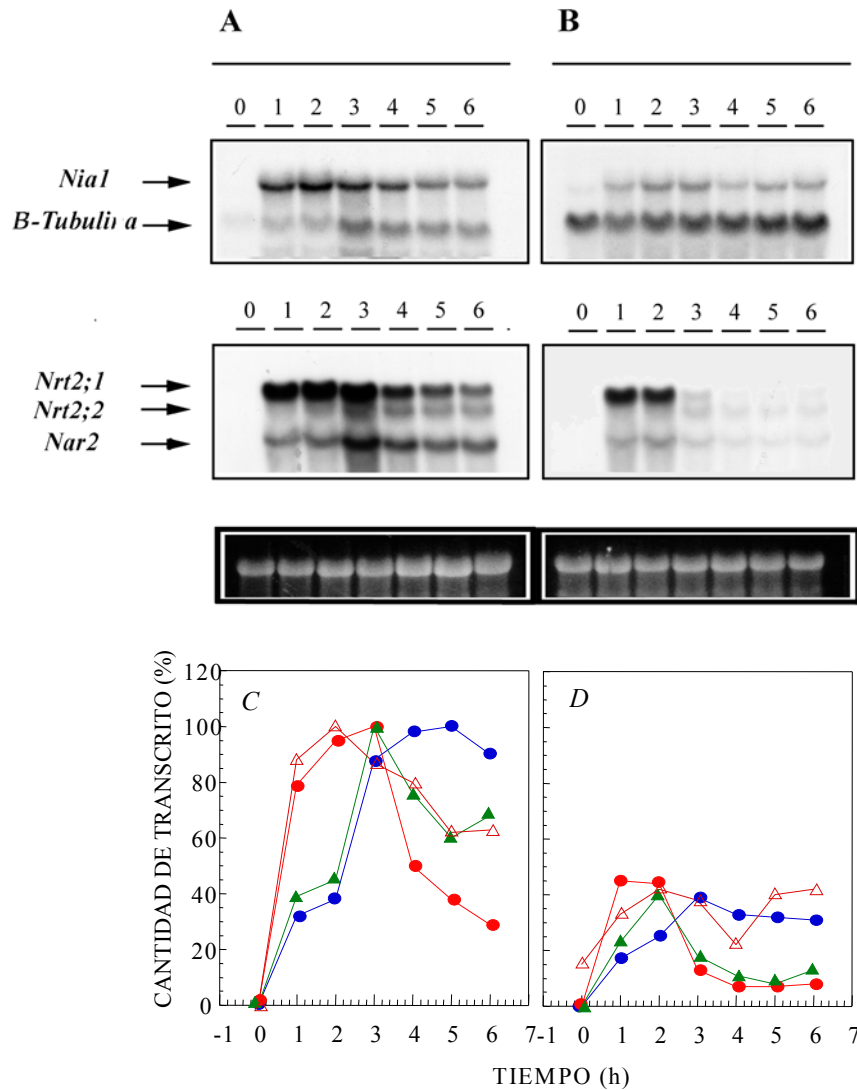


Fig.17. Expresión de los transcritos de *Nial*, *Nrt2;1*, *Nrt2;2* y *Nar2* en células de la estirpe Tx11-8. Efecto de la luz y del nitrato.

- Células de la estirpe Tx11-8 cultivadas en amonio y adaptadas a la oscuridad durante 16 h, se transfirieron a medios con nitrato 4 mM a la luz. A los tiempos indicados, se tomaron muestras para la obtención de RNA y se analizó la expresión de los correspondientes transcritos.
- Células de la estirpe Tx11-8 cultivadas en amonio y luz continua se transfirieron a un medio con nitrato 4 mM. Las muestras para RNA se procesaron como se indica en A.
- Cuantificación de los transcritos (%) de *Nial* (△), *Nrt2;1* (▲), *Nrt2;2* (●) y *Nar2* (●) correspondientes a la Fig. 17A. El 100% corresponde al valor máximo medido en unidades arbitrarias para cada transcrito.
- Cuantificación de los transcritos (%) de *Nial* (△), *Nrt2;1* (▲), *Nrt2;2* (●) y *Nar2* (●) correspondientes a la Fig.17B. El 100% corresponde al valor máximo medido en unidades arbitrarias para cada transcrito.

### Obtención de estirpes deficientes en los sistemas HANT y que expresen constitutivamente la NR.

Los datos anteriores muestran que, en medios con amonio, la expresión de una NR constitutiva daba lugar a una desregulación de los HANT que se demuestra en los valores de actividad que presenta si bien no se detectan los de transcrito. Si los HANT fuesen los únicos que se desregulan y por tanto los responsables del fenotipo de CSA, aquellas estirpes que carezcan de ellos pero que expresen el gen quimérico de la NR deberían ser CRA. Con el objeto de comprobar este aspecto, se procedió a la obtención de dichas estirpes. Para ello, se realizó un cruce genético entre la estirpe Tx11-8 y el mutante de delección G1 (Quesada et al., 1993) (Fig.18). El resultado de la segregación obtenida para 100 colonias analizadas fue de 22/78 ( $Nit^+/Nit^-$ ) y 38/62 ( $Nii^+/Nii^-$ ). Se analizaron 8 segregantes  $Nit^-/Nii^-$  (2, 6, 8, 9, 11, 12, 16 y 17) en los que se determinó la actividad NR constitutiva en medios con amonio y tras la reactivación por ferricianuro 60  $\mu$ M. De acuerdo con la segregación esperada, la mitad de las estirpes seleccionadas (2, 9, 12 y 17) expresaban constitutivamente la actividad NR y no tenían NiR. Curiosamente, estas 4 estirpes resultaron ser sensibles a clorato en presencia de amonio. Estas estirpes fueron designadas como NRcG1-2, NRcG1-9, NRcG1-12 y NRcG1-17.

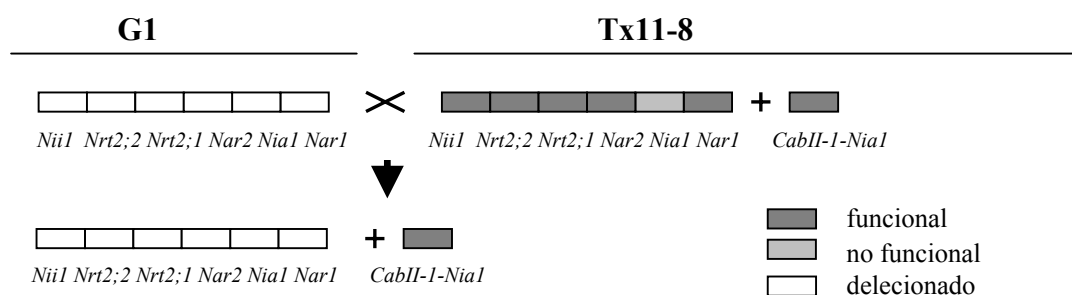


Fig.18. Obtención de mutantes  $HANT^-::CabII-1Nia1$  mediante cruce genético entre las estirpes Tx11-8 y G1.

Puesto que estas estirpes carecían de NiR, se pudo analizar fácilmente la actividad de LANT. Como muestra la figura 19, ninguna de las estirpes NRcG1 excretaba nitrito al medio a partir de nitrato 100  $\mu$ M de nitrato, lo que confirmaba la ausencia de HANT. Sin embargo, se apreció excreción de nitrito cuando la concentración de nitrato era de 4 mM y 40 mM.



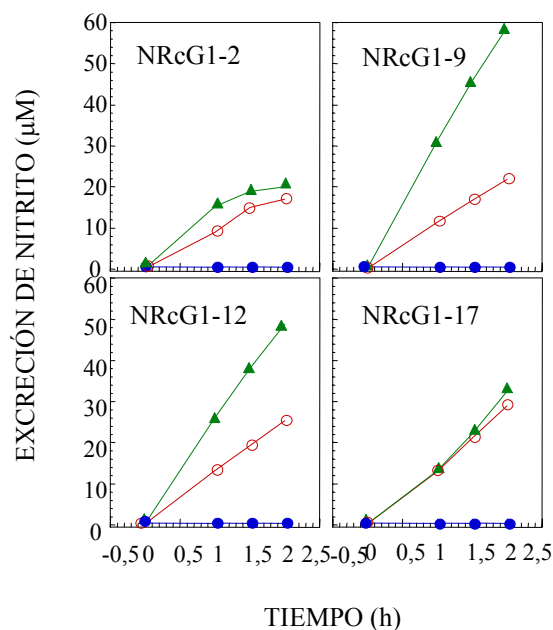


Fig.19. Excreción de nitrito a partir de nitrato en las estirpes NRcG1-2, NRcG1-9, NRcG1-12 y NRcG1-17.

Las células de las correspondientes estirpes cultivadas en amonio se transfirieron a medios con nitrato 100 µM (●), 4 mM (●) o 40 mM (▲). A los tiempos indicados, se tomaron muestras de células para determinar la concentración de nitrito excretado al medio extracelular.

El fenotipo de sensibilidad a clorato en presencia de amonio (CSA) de estas estirpes NRcG1 indicaba que el clorato también era transportado por un(os) sistema(s) diferente(s) a los *Nrt2;1/Nar2* y *Nrt2;2/Nar2*. Como ya se ha mencionado, en *C. reinhardtii* se han identificado tres sistemas de transporte de alta afinidad para nitrato y/o nitrito. Los tres en condiciones estándar se reprimen por amonio, y sus actividades se inhiben por la presencia de amonio (Galván et al., 1996). Si el nitrato/clorato entrase por los HANiT, la presencia del gen quimérico *CabII-1-Nial* debería de desregular también a estos transportadores. Para determinar si en las estirpes NRcG1 el LANT ( $\delta$ HANiT?) se inhibe por amonio, se realizó el experimento que se muestra en la figura 20. Las células de las estirpes NRcG1-2 y NRcG1-12 se indujeron en un medio que contenía amonio 4 mM y nitrato 4 mM (A4N4). En esas condiciones la NR constitutiva es totalmente activa y el sistema de baja afinidad de nitrato debería de estar inducido. Posteriormente, las células se lavaron y se transfirieron nuevamente a dos medios de cultivo, uno con nitrato 4 mM y otro con nitrato 4mM y amonio 4 mM, midiéndose la excreción de nitrito. Como se muestra en la figura 20, la excreción de nitrito se inhibió parcialmente (20-40%) por amonio.

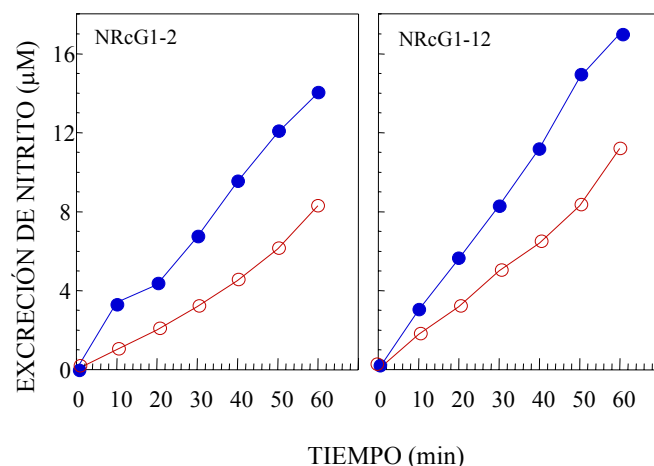


Fig. 20. Efecto del amonio en la excreción de nitrito a partir de nitrato en las estirpes NRcG1-2 y NRcG1-12. Las estirpes NRcG1-2 y NRcG1-12 cultivadas en amonio se indujeron en un medio con nitrato 4 mM y amonio 4 mM durante 4 h. Posteriormente se determinó la excreción de nitrito en células transferidas a medios con nitrato 4 mM en ausencia (●) o en presencia de amonio 4 mM (○).

### Reversión del fenotipo de CSA en estirpes que contienen el gen quimérico *CabII-1-Nia1*.

Las estirpes que contienen el gen *CabII-1/Nia* son CSA, mientras que las estirpes silvestres así como las parentales 305cw15 y G1 son CRA. Durante la comprobación del fenotipo de CSA en placas se observó que con el tiempo aparecían colonias espontáneas CRA, sobre el fondo de células muertas. Para entender el mecanismo de reversión de CSA a CRA, se seleccionaron algunas colonias revertientes de las estirpes Tx11-8 y NRcG1 que fueron caracterizadas. Como se muestra en la Tabla VIII, todos los revertientes seleccionados carecían de actividad NR y por tanto habían perdido la capacidad de excretar nitrito, cuando fueron inducidos en un medio con nitrato amónico 4 mM.

Tabla VIII. Actividad BVH-NR, sensibilidad a clorato y excreción de nitrito en las estirpes Tx11-8, NRcG1 y los revertientes espontáneos derivados de ellas.

El fenotipo de resistencia (CRA) o (CSA) sensibilidad se comprobó en un medio que contenía 100 mM de clorato y 10 mM de amonio. La actividad BVH-NR y la excreción de nitrito se determinaron en células incubadas en medios que contenían nitrato amónico 4 mM. (nd) No detectable

Estirpe	Fenotipo	Actividad NR (mU mg <sup>-1</sup> Chl)	Excreción de nitrito
Tx11-8	CSA	30	+
R-1	CRA	nd	-
R-2	CRA	nd	-
NRcG1-2	CSA	41	+
2-R-1	CRA	nd	-
NRcG1-9	CSA	46	+
9-R-1	CRA	nd	-
9-R-2	CRA	nd	-
NRcG1-12	CSA	29	+
12-R-1	CRA	nd	-
12-R-2	CRA	nd	-
12-R-3	CRA	nd	-
NRcG1-17	CSA	36	+
Nia1-305-CW15	CRA	nd	-

El análisis de la expresión del transcrito *CabII-1-Nia1* de estas estirpes revertientes se muestra en la figura 21. Todas las estirpes expresaban el gen quimérico en medios con amonio aunque como se muestra en la Tabla VIII, no se pudo detectar actividad NR.

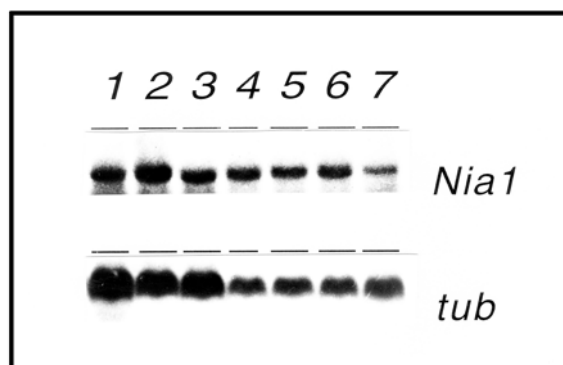


Fig.21. Expresión del transcrito de *CabII-1-Nia1* en los mutantes espontáneos CRA de las estirpes Tx11-8 y NRcG1.

Se obtuvieron los RNA totales de las estirpes Tx11-8 (1), R-1 (2), R-2 (3), NRcG1-2 (4), 2-R-1 (5), NRcG1-12 (6) y 12-R-1 (7) cultivadas en medio mínimo con amonio, que se hibridaron con sondas específicas de *Nia1* (pB6a5.1) y el cDNA de la  $\beta$ -Tubulina.

Los datos obtenidos hasta ahora indican que hay una relación entre la actividad NR constitutiva y el fenotipo de CSA y que la actividad NR regula la actividad de los HANT y LANT para nitrato. Para entender este mecanismo de interregulación, se procedió a aislar y caracterizar un mayor número de revertientes CRA a partir de la estirpe Tx11-8. Con ello se pretendían aislar estirpes Nit<sup>+</sup>, que además de ser CRA tuviesen unos valores normales de actividad NR. De esta forma se habría interferido en la función de algún/os gen/es esencial/es para la interconexión reguladora entre la NR y sistemas de transporte de nitrato/nitrito/clorato.

Se sembraron células de la estirpe Tx11-8 (aproximadamente 10<sup>7</sup> células) en medios sólidos con clorato 100 mM y amonio 8 mM. Tras 10 días en la cámara de cultivo se obtuvieron 75 colonias CRA. Las 75 estirpes mutantes fueron purificadas manteniendo en todo momento la presión selectiva del clorato en presencia de amonio, aunque a una menor concentración (10 mM). A esta concentración de clorato, la estirpe Tx11-8 es también CSA. Estas colonias fueron analizadas para su crecimiento en nitrato. De las 75 estirpes CRA, 45 fueron Nit<sup>-</sup> y 30 Nit<sup>+</sup>. Se seleccionaron 16 colonias Nit<sup>-</sup> (1b<sup>-</sup>, 8b<sup>-</sup>, 9b<sup>-</sup>, 10b<sup>-</sup>, 13b<sup>-</sup>, 15b<sup>-</sup>, 17b<sup>-</sup>, 18b<sup>-</sup>, 19b<sup>-</sup>, 20b<sup>-</sup>, 21b<sup>-</sup>, 4c<sup>-</sup>, 12c<sup>-</sup>, 13c<sup>-</sup>, 15c<sup>-</sup> y 20c<sup>-</sup>) y 29 Nit<sup>+</sup> (12a<sup>+</sup>, 2b<sup>+</sup>, 3b<sup>+</sup>, 5b<sup>+</sup>, 6b<sup>+</sup>, 11b<sup>+</sup>, 12b<sup>+</sup>, 16b<sup>+</sup>, 22b<sup>+</sup>, 25b<sup>+</sup>, 26b<sup>+</sup>, 27b<sup>+</sup>, 31b<sup>+</sup>, 37b<sup>+</sup>, 40b<sup>+</sup>, 41b<sup>+</sup>, 47b<sup>+</sup>, 48b<sup>+</sup>, 50b<sup>+</sup>, 1c<sup>+</sup>, 5c<sup>+</sup>, 6c<sup>+</sup>, 7c<sup>+</sup>, 10c<sup>+</sup>, 11c<sup>+</sup>, 14c<sup>+</sup>, 22c<sup>+</sup>, 23c<sup>+</sup> y 24c<sup>+</sup>). En una primera caracterización se determinaron: 1) las actividades BVH-NR y NADH-NR correspondientes al gen quimérico, 2) la respuesta a la inducción por nitrato en estas actividades, ya que la falta en la señalización por nitrato podría ser una causa en el fenotipo de CRA, y 3) la actividad MoCo.

Todas las estirpes Nit<sup>-</sup> carecían de actividad de MoCo y por tanto de actividad NR. Los datos obtenidos para las estirpes Nit<sup>+</sup> se muestran en la Tabla IX. La mayor parte de las estirpes mostraron valores muy bajos e incluso no detectables de actividad NR a excepción de 4 estirpes (23c<sup>+</sup>, 6b<sup>+</sup>, 48b<sup>+</sup> y 50b<sup>+</sup>) que tenían unos valores de actividad comparables a los de la estirpe Tx11-8 (Tabla IX). Curiosamente sólo la estirpe 23c<sup>+</sup> tenía valores de actividad MoCo elevados, ya que en el resto de las estirpes la actividad de MoCo disminuía entre el 80-97%.

Tabla IX. Actividades BVH-NR, NADH-NR y MoCo en las estirpes Nit<sup>+</sup> CRA-Tx11-8.

Las actividades BVH-NR y NADH-NR se determinaron en células de las estirpes indicadas en medios con amonio 8 mM (A8) en presencia de ferricianuro potásico 60 µM (A8 + FeCy) o tras 3 h de inducción en medios con nitrato 4 mM (N4). La actividad MoCo (en mU/ mg Prot) se midió a partir de extractos crudos de células cultivadas en medios con amonio 8 mM.

Todas las actividades NR se expresan en mU/ mg Chl; (%) Valores de actividad referidos a la estirpe Tx11-8. (nd) No detectable

Estirpes	A8 + FeCy		N4		A8
	BV-NR	NADH-NR	BV-NR	NADH-NR	MoCo
Tx11-8	34,8 (100%)	16,4 (100%)	42,7(100%)	20,5 (100%)	16,4 (100%)
12a <sup>+</sup>	nd	nd	6,4 (15%)	3,5 (17%)	nd
2b <sup>+</sup>	4,8 (13%)	2,8 (17%)	10,4 (24%)	0,96 (4,6%)	2,25 (13,7%)
3b <sup>+</sup>	nd	nd	nd	nd	0,53 (3,2%)
5b <sup>+</sup>	4 (11,5%)	1 (6,1%)	3 (7%)	3,5 (17,1%)	0,37 (2,29%)
6b <sup>+</sup>	8,5 (24%)	5,5 (33%)	31 (72%)	3,9 (19%)	0,86 (5,2%)
11b <sup>+</sup>	nd	1,5 (9%)	2,7 (6%)	nd	0,86 (5,24%)
12b <sup>+</sup>	3,8 (10%)	3,8 (23%)	12 (28%)	1,7 (8%)	2,77 (16,9%)
16b <sup>+</sup>	8,3 (24%)	6,2 (37%)	14 (32%)	2,3 (11%)	2,83 (17,2%)
22b <sup>+</sup>	nd	0,9 (5%)	nd	nd	0,47 (2,86%)
25b <sup>+</sup>	4,2 (12%)	3,4 (20%)	nd	6,3 (30%)	1,13 (6,9%)
26b <sup>+</sup>	1,6 (4%)	1,1 (6,7%)	7,3 (17%)	5,7 (27%)	1,9 (11,6%)
27b <sup>+</sup>	6,4 (18,4%)	1,2 (7,3%)	2,8 (6,5%)	5,7 (27,8)	0,58 (3,54%)
31b <sup>+</sup>	nd	1 (6%)	nd	nd	0,62 (3,78%)
37b <sup>+</sup>	2,7 (7%)	2,1 (12%)	4 (9%)	nd	2,6 (15,8%)
40b <sup>+</sup>	2,2 (6%)	1,9 (11%)	4,9 (11%)	4,4 (21%)	1,6 (9,7%)
41b <sup>+</sup>	2,5 (7%)	2,2 (13%)	1,5 (3,5%)	2,6 (12%)	1,5 (9,1%)
47b <sup>+</sup>	nd	1,9 (11%)	2 (4%)	1,9 (9%)	3 (18,3%)
48b <sup>+</sup>	8,3 (23%)	4,3 (26%)	21 (49%)	12 (58%)	1,41 (8,6)
50b <sup>+</sup>	11,8 (34%)	8 (48%)	52 (121%)	3,5 (17%)	1,24 (7,6%)
1c <sup>+</sup>	nd	1,4 (8%)	nd	nd	1,37 (8,35%)
5c <sup>+</sup>	nd	1 (6%)	1 (2%)	nd	0,3 (1,82%)
6c <sup>+</sup>	2,6 (7,5%)	3 (18%)	4 (9,4%)	nd	3,14 (19,1%)
7c <sup>+</sup>	nd	2,1 (12%)	nd	1,1 (5%)	0,87 (5,3%)
10c <sup>+</sup>	2,6 (7%)	1,1 (6,7%)	7,9 (18%)	3,7 (18%)	2,38 (14,5%)
11c <sup>+</sup>	3,6 (10%)	2,8 (17%)	2,3 (5,3%)	3,7 (18%)	0,78 (4,75%)
14c <sup>+</sup>	3,7 (10%)	2,6 (15%)	nd	3,8 (18%)	0,59 (3,6%)
22c <sup>+</sup>	7,6 (21%)	6,1 (37%)	16 (37%)	2 (9%)	4 (24,4%)
23c <sup>+</sup>	15 (43%)	6,2 (37%)	67 (156%)	6,2 (30%)	11,23 (68,5)
24c <sup>+</sup>	2,8 (8%)	2,7 (16%)	nd	4,4 (21%)	0,78 (4,75%)

En tres estirpes representativas CRA-Nit<sup>+</sup> (5b<sup>+</sup>, 27b<sup>+</sup> y 12a<sup>+</sup>) y tres estirpes CRA-Nit<sup>-</sup> (1b<sup>-</sup>, 13b<sup>-</sup> y 17b<sup>-</sup>) se determinó la actividad xantina deshidrogenasa en comparación con la estirpe CSA Tx11-8 y la estirpe silvestre, comprobándose que la expresión de esta actividad se corresponde con los valores de MoCo obtenidos (Fig.22).

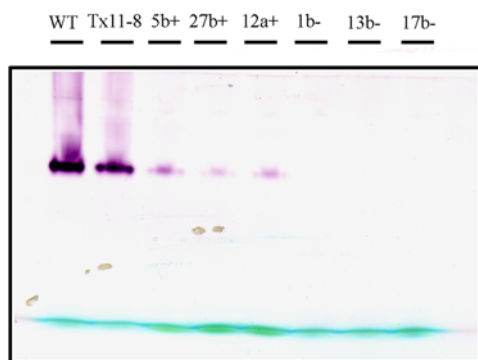


Fig.22. Actividad xantina deshidrogenasa de las estirpes CRA (12a<sup>+</sup>, 5b<sup>+</sup>, 27b<sup>+</sup>, 1b<sup>-</sup>, 13b<sup>-</sup> y 17b<sup>-</sup>), Tx11-8 y estirpe silvestre (WT). La actividad xantina deshidrogenasa se estimó mediante tinción tras PAGE a partir de extractos crudos de células inducidas en medios carentes de nitrógeno en presencia de xantina 1 mM durante 24 h (ver Materiales y Métodos).

Según los datos de la Tabla IX y del fenotipo Nit<sup>+</sup>/Nit<sup>-</sup>, se ha seleccionado una serie de estirpes CRA-Tx11-8 que se han clasificado en cuatro grupos para su posterior estudio (Tabla X).

Tabla X. Clasificación de estirpes CRA-Tx11-8. La clasificación de las estirpes CRA se realizó en función de los valores de actividad BVH-NR, NADH-NR así como de actividad MoCo. (+) crecimiento o actividades más o menos comparables a los de la estirpe Tx11-8; (+/-) valores significativamente disminuidos; (nd) no detectable; (-) actividad nula o crecimiento nulo en nitrato.  
(\* ) Estirpes que durante el desarrollo de este trabajo han alterado su fenotipo Nit<sup>+</sup>.

Clasificación	Estirpes	Nit <sup>+</sup>	MoCo	BVH-NR	NADH-NR
Grupo 1	1b <sup>-</sup> , 13b <sup>-</sup> , 17b <sup>-</sup> , 4c <sup>-</sup> , 15c <sup>-</sup> y 20c <sup>-</sup>	-	-	-	-
Grupo 2	6b <sup>+</sup> , 16b <sup>+</sup> , 27b <sup>+</sup> , 48b <sup>+</sup> , 50b <sup>+</sup>	+	+/-	+	+
Grupo 3	12a <sup>+</sup> (*), 3b <sup>+</sup> (*), 5b <sup>+</sup> , 1c <sup>+</sup>	+	+/-	+/- (nd)	+/- (nd)
Grupo 4	23c <sup>+</sup>	+	+	+	+

### Análisis genético de los mutantes CRA derivados de la estirpe Tx11-8.

Para obtener información sobre la(s) mutación(es) que confieren la resistencia a clorato en medios con amonio, se ha realizado un análisis genético, así como un estudio de complementación mediante la obtención de diploides.

Los resultados de los cruces entre las estirpes CRA-Tx11-8 Nit<sup>+</sup> y Nit<sup>-</sup> y la estirpe 305d (Nit<sup>-</sup>) se muestran en la Tabla XI. La segregación encontrada en el cruce de las estirpes Nit<sup>-</sup> CRA con la estirpe *Nia1*-305 fue próxima a 3:1 (CRA/CSA) y 1:3 (Nit<sup>+</sup>/Nit<sup>-</sup>); y en el cruce de las estirpes Nit<sup>+</sup> CRA con *Nia1*-305 fue próxima a 3:1 (CRA/CSA) y 1:1 (Nit<sup>+</sup>/Nit<sup>-</sup>) (Tabla XI). Estos datos indican que ninguna de las mutaciones en dichas estirpes CRA, está ligada al gen quimérico *CabII-1-Nia1*. Esto se deduce porque si la mutación responsable del fenotipo de CRA estuviera ligada a la copia funcional *CabII-1-Nia1*, no se obtendría ningún segregante con el fenotipo CSA/Nit<sup>+</sup>. Sin embargo, en todos los cruces realizados, independientemente de que se trate de estirpes Nit<sup>+</sup> como Nit<sup>-</sup>, aparecen en una proporción elevada segregantes con este fenotipo.

Tabla XI. Cruce genético entre las estirpes CRA-Tx11-8 y la estirpe 305d.

Los medios de selección utilizados en el análisis de los segregantes obtenidos en los cruces han sido medios con nitrato 4 mM o clorato 100 mM + amonio 8 mM. La estirpe 305d es una estirpe derivada del mutante *Nia1*-305 (mt<sup>-</sup>).

Cruce	Fenotipo	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	CRA/CSA	CSA/Nit <sup>+</sup>	CRA/Nit <sup>+</sup>
1b <sup>-</sup> x 305d	Nit <sup>-</sup> /Nit <sup>-</sup>	26/74 (1:3)	74/26 (3:1)	20	1
13b <sup>-</sup> x 305d	Nit <sup>-</sup> /Nit <sup>-</sup>	29/71 (1:2,4)	72/28 (2,6:1)	27	1
17b <sup>-</sup> x 305d	Nit <sup>-</sup> /Nit <sup>-</sup>	28/72 (1:2,6)	71/29 (2,4:1)	27	1
4c <sup>-</sup> x 305d	Nit <sup>-</sup> /Nit <sup>-</sup>	29/71 (1:2,4)	73/27 (2,7:1)	27	1
20c <sup>-</sup> x 305d	Nit <sup>-</sup> /Nit <sup>-</sup>	33/67 (1:2)	66/34 ((2:1)	31	1
23c <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	51/49 (1:1)	73/27 ((3:1)	26	23
16b <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	55/45 (1,2:1)	62/38 (1,6:1)	36	17
27b <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	49/51 (1:1)	66/34 (2:1)	37	10
48b <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	57/43 (1,3:1)	62/38 (1,6:1)	38	15
50b <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	47/53 (1:1,1)	72/28 (2,6:1)	28	16
5b <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	49/51 (1:1)	79/21(3,8:1)	19	30
1c <sup>+</sup> x 305d	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	56/44 (1,3:1)	56/44 (1,3:1)	44	12

Las estirpes 23c<sup>+</sup> (grupo 4) y 1c<sup>+</sup> (grupo 3) se cruzaron con la estirpe G1 para determinar en estos casos, si la mutación está ligada a la región genómica de *Nia1* que puede seguirse a partir del fenotipo de crecimiento en nitrito (Niit) de la estirpe G1.

Tabla XII. Cruces genéticos de las estirpes 23c<sup>+</sup> y 1c<sup>+</sup> con la estirpe G1.

Los medios de selección utilizados han sido medios sólidos con nitrato 4mM, clorato 100 mM + amonio 8 mM, y nitrito 1,5-2 mM.

Cruce	Nit <sup>+</sup> /Nit <sup>-</sup>	Niit <sup>+</sup> /Niit <sup>-</sup>	CRA/CSA	Nit <sup>+</sup> CRA/CSA	Niit <sup>-</sup> CRA/CSA
23c <sup>+</sup> x G1	16/84 (1:5,2)	50/50 (1:1)	71/29 (2,4:1)	5/11	33/17
1c <sup>+</sup> x G1	29/71 (1:2,4)	63/37 (1,7:1)	62/38 (1,6:1)	4/25	20/17

La segregación resultante del cruce de las estirpes 23c<sup>+</sup> con la estirpe G1 nos confirma la aparición de estirpes CSA/Nit<sup>+</sup> y CSA/Niit<sup>-</sup> entre los segregantes, como en el caso anterior (Tabla XI, Fig.18), esta segregación indica que la mutación que confiere el carácter de CRA en la estirpe 23c<sup>+</sup> no está ligada a la copia de NR quimérica. La segregación Niit<sup>-</sup> CRA/CSA próxima a 2:1 sugiere además que la mutación que confiere CRA en presencia de la NR quimérica no está ligada a la región genómica de la agrupación de genes *Nia1*. El cruce de la estirpe 23c<sup>+</sup> con la estirpe G1 nos puede servir como instrumento para una caracterización futura de la mutación, a través del análisis de los segregantes Niit<sup>-</sup>/CRA, donde la mitad de estos deben poseer la copia funcional *CabII-1-Nia1*. Los resultados en el cruce del 1c<sup>+</sup> con la estirpe G1 fueron similares a los del cruce con el 23c<sup>+</sup>.

El análisis preliminar de las estirpes CRA-Nit<sup>-</sup>-Tx11-8 mostró que estos mutantes están afectados en los genes relacionados con la biosíntesis de MoCo. En *C. reinhardtii* se han identificado al menos 5 genes implicados en la biosíntesis del MoCo: *Nit4*, 5 y 6, relacionados con el metabolismo del molibdeno, y *Nit3* y *Nit7*, relacionados con la biosíntesis de molidopterina. Ya que disponemos de mutantes afectados en estos *loci*, tales como las estirpes 307 (*Nit3*), 104 (*Nit4*), 102 (*Nit5* y *Nit6*), H1 y F23 (*Nit7*) (Fernández et al., 1998; Harris et al., 1989; Aguilar et al., 1992a), se han realizado estudios de complementación *in vivo* de las estirpes mencionadas con las CRA-Nit<sup>-</sup> del Grupo 1 (1b<sup>-</sup>, 3b<sup>-</sup>, 17b<sup>-</sup>, 4c<sup>-</sup>, 15c<sup>-</sup> y 20c<sup>-</sup>) (ver Materiales y Métodos). La ausencia de complementación por formación de diploides (Tabla XIII) significaría que se trata de mutación(es) identificadas anteriormente y relacionadas con la biosíntesis del MoCo.



Tabla XIII. Complementación mediante obtención de diploides de mutantes afectados en genes relacionados en la biosíntesis del MoCo en *C. reinhardtii*

La selección de los diploides se realizó en placas de medio sólido con nitrato 4 mM, (+) complementación, (-) no complementación. Las estirpes 307d, 104d y 102d son estirpes derivadas de las estirpes 307, 104 y 102, a las que hemos cambiado el sexo ( $mt^-$ ) mediante cruce con el silvestre de *C. reinhardtii*, 6145c.

Estirpe	307d	104d	102d	H1
1b <sup>-</sup>	+	+	+	-
13b <sup>-</sup>	+	+	+	+
17b <sup>-</sup>	+	+	+	-
4c <sup>-</sup>	+	+	+	+
15c <sup>-</sup>	+	-	-	+
20c <sup>-</sup>	+	+	+	+

Como muestra la Tabla XIII de las 6 estirpes analizadas hay tres tipos de mutantes, las estirpes 13b<sup>-</sup>, 4c<sup>-</sup> y 20c<sup>-</sup> que pueden estar afectadas en genes diferentes a los previamente identificados, las estirpes 1b<sup>-</sup> y 17b<sup>-</sup> que parecen presentar la mutación *Nit-7*, y la estirpe 15c<sup>-</sup> que presentaría mutaciones en los genes *Nit4*, *Nit5* y *Nit6*. El caso de la estirpe 15c<sup>-</sup> es curioso por el hecho de no complementar con los mutantes 102d y 104d, lo que sugiere que el 15c<sup>-</sup> porta tres mutaciones, o bien que el gen afectado en esta estirpe es limitante cuando otras dosis génicas para la biosíntesis del MoCo también lo son. Para confirmar estas hipótesis se necesita unos análisis genéticos más precisos

#### **Expresión de los transcritos de *Nia1*, *Nrt2;1* y *Nar2* en las estirpes CRA-Tx11-8 correspondientes a los grupos 1, 2, 3 y 4.**

La figura 23 muestra que las estirpes analizadas CRA-Tx11-8  $Nit^+$  y  $Nit^-$  expresaban el transcrito *Cab II-1-Nia1* en medios con amonio (Fig. 23A) y que tras la inducción en medios con nitrato, durante 3 h, se expresaban cantidades elevadas de los transcritos de *Nia1* (Fig.23B), *Nrt2;1*, y *Nar2* (Fig. 23C).

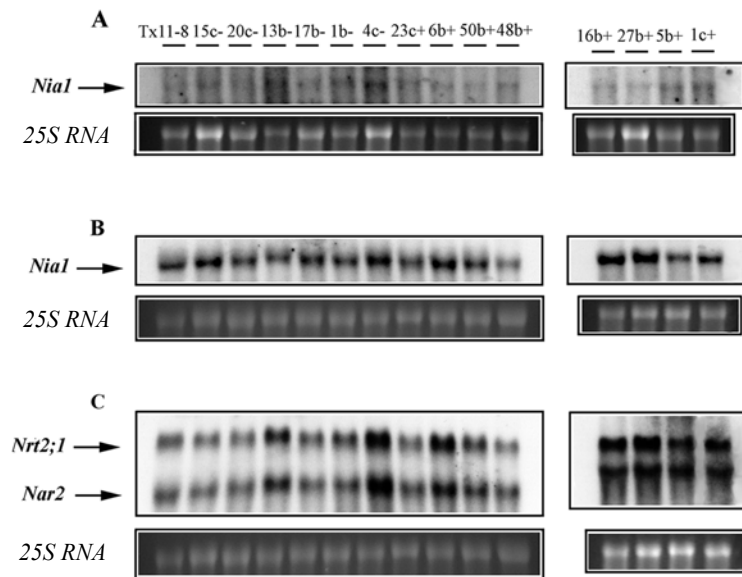


Fig.23. Expresión de los transcritos *Nia1*, *Nrt2;1* y *Nar2* en las estirpes CRA- Tx11-8.

A. Expresión del transcrito de *Nia1* en medios con amonio 8 mM.

B. Expresión del transcrito de *Nia1* en medios con nitrato 4 mM.

C. Expresión de los transcritos de *Nrt2;1* y *Nar2* en medios con nitrato 4 mM.

### Actividad de los HANT/HANiT en las estirpes CRA del grupo 1, 2 y 3.

Nuestra hipótesis es que en *C. reinhardtii*, la toxicidad al clorato se debe fundamentalmente a su entrada por los HANT/HANiT. Si bien, se han identificado otros 7 *loci* que confieren resistencia a clorato y que podrían regular la actividad de estos transportadores (Prieto y Fernández, 1993).

Para evaluar la actividad de los HANT/HANiT en las estirpes Nit<sup>-</sup>, nos basamos en las características de los tres sistemas de transporte de *C. reinhardtii* que se recogen en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Características de los sistemas HANT y HANiT identificados en *C. reinhardtii*. En esta tabla se muestran diferentes sistemas de transporte existentes en *C. reinhardtii*, así como la afinidad que presentan por diversos sustratos. Sistemas específicos (+) y no específicos (-) (Galván et al., 1996).

	Sistema I <i>Nrt2;1/Nar2</i>	Sistema II <i>Nrt2;2/Nar2</i>	Sistema III <i>Nrt2;3</i>
Transporte de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (0,1mM)	+	-	+
Transporte de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0,1mM)	+	+	-
Inhibición por ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (2mM) sobre el transporte de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 0,1 mM	Si	No	No
Inhibición por NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 0,1mM sobre el transporte de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 0,1mM	Si		No

Células de las estirpes Nit<sup>-</sup> (grupo 1) cultivadas en amonio se transfirieron a medios con nitrito 100 µM, y se determinó la inducción de la actividad HANiT. A continuación, una vez inducido el sistema se estudió el efecto inhibitor del nitrato 100 µM y del clorato 2 mM. Los resultados que se recogen en la Tabla XV fueron:

1. Todas las estirpes Nit<sup>-</sup> CRA inducían una actividad de transporte de nitrito superior a la estirpe Tx11-8 (Nit<sup>+</sup> CSA).
2. En todas se observó una inhibición por nitrato, lo que indicaba que el sistema *Nrt2;1/Nar2* era funcional.
3. En ningún caso se obtuvo una inhibición significativa por clorato.

Tabla XV. Velocidades de consumo de nitrito de las estirpes CRA-Tx11-8 -Nit<sup>-</sup>. Las concentraciones iniciales de nitrato, nitrito y clorato son las indicadas en la Tabla XIV. El porcentaje de inhibición está referido a la velocidad mostrada por cada una de las estirpes en el transporte de nitrito sin inhibidor.

Estirpe	Velocidad de consumo de nitrito (µmol/h/mg Chl)		
	Control	+ Nitrato	+ Clorato
Tx11-8	2,46	1,4 (57%)	2,7 (0%)
13b <sup>-</sup>	6	3,6 (40%)	6,6 (0%)
17b-	7	4,4 (37%)	7,75 (0%)
1b-	7,5	2,6 (65%)	8,7 (0%)
4c-	6,7	2,1 (70%)	6,9 (0%)
15c-	5,1	2,5 (51%)	4,5 (11%)
20c-	7,7	1,6 (80%)	7,4 (3%)

En el caso de las estirpes Nit<sup>+</sup> CRA fue posible determinar la actividad de HANT a partir de la medida de consumo de nitrato del medio. Como muestra la figura 24, las estirpes pertenecientes a los grupos 2 y 3 consumían nitrato a concentraciones micromolares, aunque a una velocidad significativamente inferior a la estirpe Tx11-8. Lo que se correlacionaba con los bajos valores de actividad NR. En esta figura es de resaltar que la estirpe 27b<sup>+</sup> no llegaba a agotar el nitrato del medio.

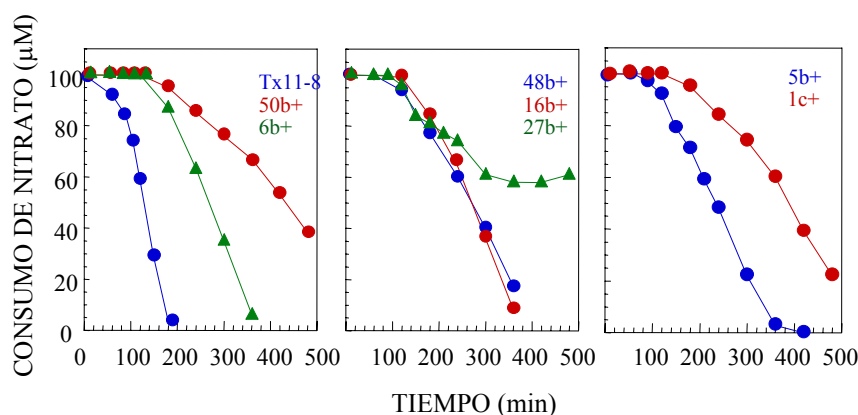


Fig.24. Consumo de nitrato por las estirpes CRA-Tx11-8-Nit<sup>+</sup>.

Las células de las estirpes Nit<sup>+</sup> CRA cultivadas en medios con amonio fueron transferidas a un medio que contenía nitrato 100 μM. El consumo de nitrato se midió mediante HPLC tal como se describe en Materiales y Métodos.

La actividad de consumo de nitrito también se determinó en estas estirpes Nit<sup>+</sup> CRA (Tabla XVI). En este caso es de destacar que: 1) excepto la estirpe 48b<sup>+</sup>, todas las demás estirpes Nit<sup>+</sup> inducían valores de actividad de transporte de nitrito comparables a la estirpe Tx11-8; 2) en todas las estirpes, el transporte de nitrito se inhibía por nitrato lo que indica que el sistema *Nrt2;1/Nar2* era funcional y 3) en todas las estirpes sorprendentemente, excepto la 6b<sup>+</sup>, el clorato aumentaba de dos a tres veces la actividad de transporte de nitrito.

Tabla XVI. Velocidades de consumo de nitrito de las estirpes Nit<sup>+</sup> CRA-Tx11-8.

Las concentraciones iniciales de nitrato, nitrito y clorato son las indicadas en la Tabla XIV. El porcentaje de inhibición está referido a la velocidad mostrada por cada una de las estirpes en el transporte de nitrito sin inhibidor. (ND) Valor no determinado.

Velocidad de consumo de nitrito (μmol/h/mg Chl)			
Estirpes	Control	+ Nitrato	+ Clorato
Tx11-8	3,6	0,69 (81%)	4,35
6b <sup>+</sup>	4,3	ND	4,6
50b <sup>+</sup>	5,65	3,5 (38%)	10,9
48b <sup>+</sup>	7	4,5 (35%)	16
16b <sup>+</sup>	4,6	2,3 (50%)	9,6
27b <sup>+</sup>	5	2,5 (50%)	10,5
5b <sup>+</sup>	4,39	4,5 (0%)	11,2
1c <sup>+</sup>	4,6	1,75 (62%)	14

### Caracterización de la estirpe 23c<sup>+</sup> (CRA-Tx11-8).

La estirpe 23c<sup>+</sup> tenía un fenotipo interesante y se estudió en mayor detalle, ya que fue la única estirpe Nit<sup>+</sup> que siendo CRA mostraba valores de actividad NR y MoCo comparables a los de la estirpe Tx11-8 (Tabla IX).

Las figuras 25 y 26 muestran que la inducción de las actividades de transporte de nitrato (Fig.25) y nitrito (Fig.26A) eran similares en las estirpes 23c<sup>+</sup> y Tx11-8. En las células previamente inducidas con nitrito, la inhibición por nitrato en el transporte de nitrito (Fig.26B) indicaba que el sistema *Nrt2;1/Nar2* era funcional en la estirpe 23c<sup>+</sup>, pero el clorato no afectaba a la actividad de transporte de nitrito (Fig.26C).

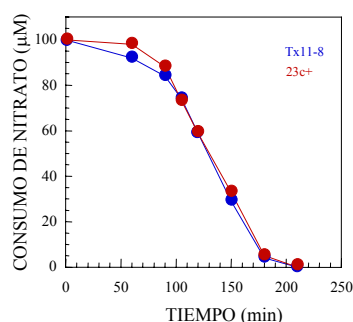


Fig.25. Consumo de nitrato por las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup>.

El consumo de nitrato se midió por HPLC según se describe en Materiales y Métodos. Otros detalles como en la figura 24.

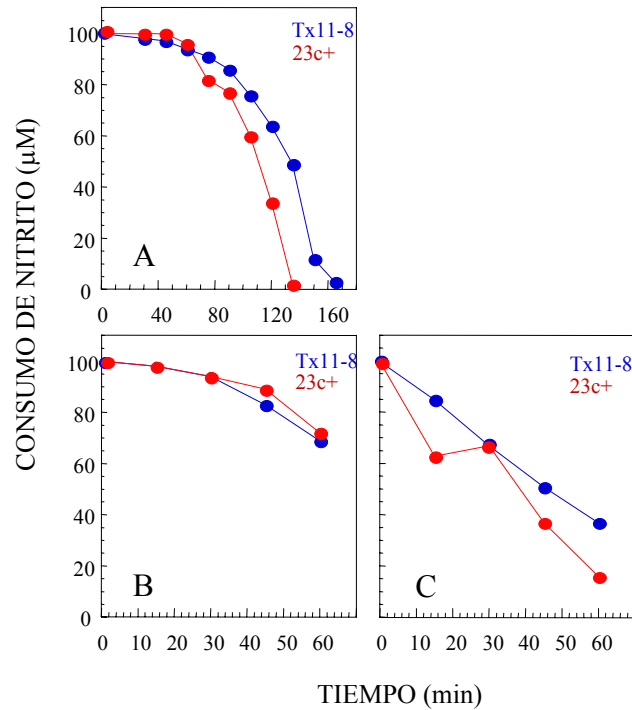


Fig.26. Consumo de nitrito por las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup>.

- A. Consumo de nitrito 100  $\mu\text{M}$
- B. Consumo de nitrito 100  $\mu\text{M}$  en presencia de nitrato 100  $\mu\text{M}$  en células inducidas con nitrito.
- C. Consumo de nitrito 100  $\mu\text{M}$  en presencia de clorato 2 mM en células inducidas con nitrito.

La expresión de la actividad NR se determinó comparativamente con la estirpe Tx11-8 en las siguientes condiciones. Células cultivadas en amonio se pasaron a la oscuridad durante 16 h para reprimir la expresión de gen quimérico *CabII-1-Nia1*. A continuación, se transfirieron a la luz en medios que contenían amonio, amonio más nitrato o nitrato. A los tiempos indicados en las figuras 27 y 28, se tomaron muestras para la determinación de las actividades BVH-NR y NADH-NR. En medios con amonio o amonio más nitrato, sólo se tiene la actividad correspondiente al gen quimérico (Prieto, 1993) y en medios con nitrato se determinaría la respuesta de esta actividad a la señalización por nitrato. Los resultados fueron los siguientes: En medios con nitrato más amonio (Figs.27C y 28B) o nitrato (Figs.27D y 28C) el patrón de expresión de las actividades NR era similar en ambas estirpes. En medios con amonio, sí se observaron diferencias importantes entre las estirpes 23c<sup>+</sup> y Tx11-8 (Figs.27A y B y 28A). Primero, la expresión de la actividad NADH-NR era incluso mayor en la estirpe 23c<sup>+</sup> que en la Tx11-8 (Fig.28A). Segundo, en la estirpe Tx11-8 se observaba el efecto activador del ferricianuro sobre la actividad BVH-NR (Fig.27.A y B), como ya ha sido descrito previamente (Prieto, 1993), pero no en la estirpe 23c<sup>+</sup>. En todos los casos la actividad

NADH-NR caía tras 24 h a valores que eran inferiores en la estirpe 23c<sup>+</sup> que en la estirpe Tx11-8.

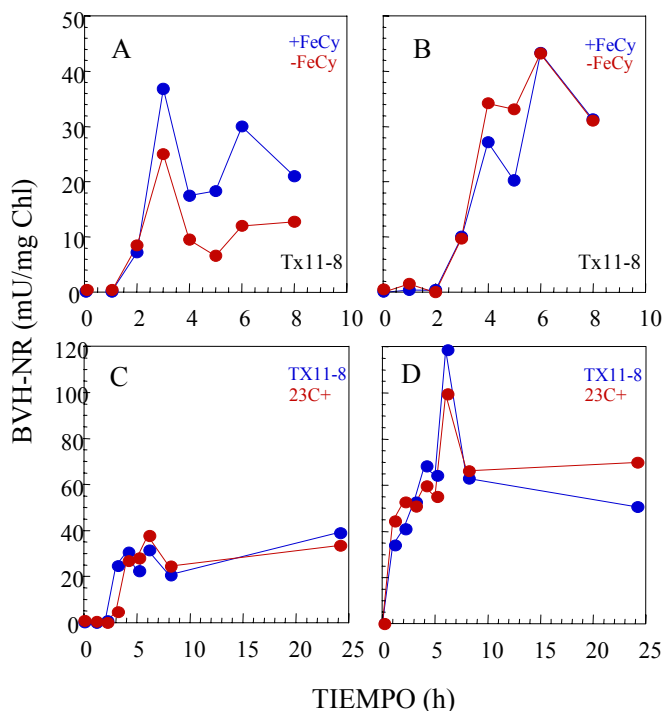


Fig.27. Inducción de la actividad BVH-NR en las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup> en distintos medios de cultivo. Las células de las estirpes indicadas se transfirieron a los medios indicados tras un periodo de 16 h en medios con amonio en la oscuridad.

(A y B) Actividad BVH-NR en medios con amonio 8 mM determinada en presencia o ausencia de ferricianuro potásico 60  $\mu$ M ( $\pm$  FeCy). (C) Actividad BVH-NR en medios con nitrato amónico 4 mM. (D) Actividad BVH-NR en medios con nitrato 4 mM.

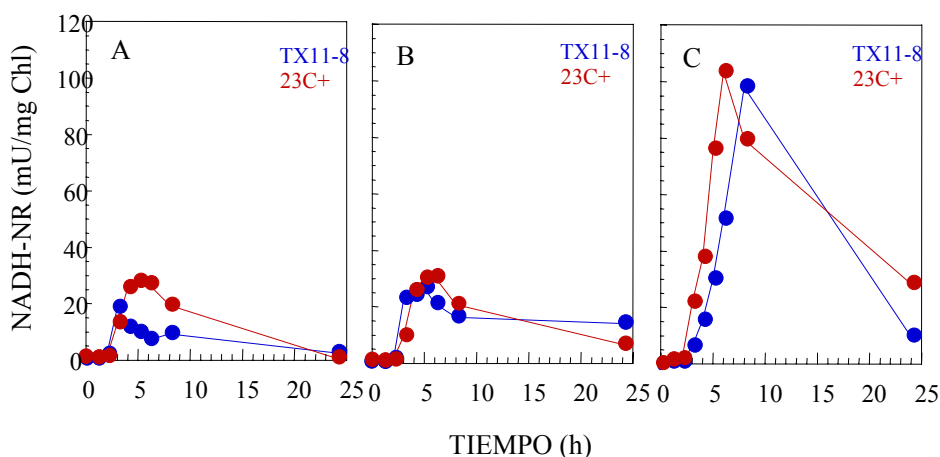


Fig.28. Inducción de la actividad NADH-NR de las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup> en distintos medios de cultivo. Las condiciones experimentales son como en la figura 27.(A) Actividad NADH-NR en medios con amonio 8 mM. (B) Actividad NADH-NR en medios con nitrato amónico 4 mM. (C) Actividad NADH-NR en medios con nitrato 4 mM.

En medios con nitrato amónico se siguió paralelamente la actividad de transporte y reducción de nitrato del siguiente modo (Fig.29). En esta condición, la actividad NR constitutiva permitía la expresión de las actividades de transporte y reducción de nitrato, como este nitrato no puede ser asimilado eficientemente se excreta en forma de nitrito. Como se muestra en la figura 29A, la estirpe Tx11-8 adaptada a la luz excretaba significativamente más nitrito que la estirpe 23c<sup>+</sup>, en medios con nitrato amónico. Cuando ambas estirpes se incubaron en la oscuridad y luego se pasaban a la luz, la actividad de excreción de nitrito eran iguales en ambas estirpes (Fig.29B). Si se tomaban células de 6 h en esta condición y se transferían a medio nuevos para determinar la actividad de excreción de nitrito a partir de nitrato amónico, en ambas estirpes eran iguales (Fig.29C). En cambio, después de 24 h de exposición a la luz (Fig.29D), se volvían a observar diferencias en la excreción de nitrito de modo similar a como ocurría en la condición A.

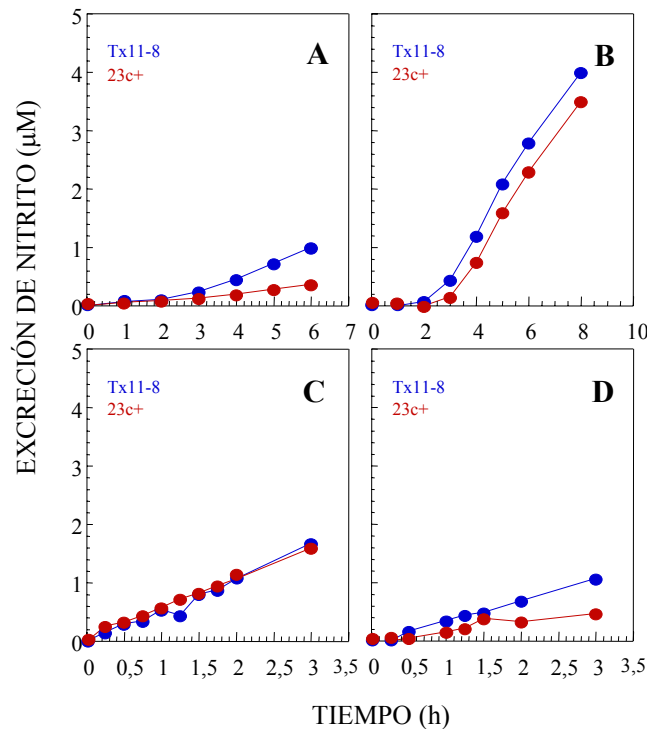


Fig.29. Excreción de nitrito en células adaptadas a la luz y sincronizadas de las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup>.

A. Excreción de nitrito en células procedentes de cultivos de amonio adaptados en luz continua que fueron transferidos a medios con nitrato amónico 4 mM.

B. Excreción de nitrito en células de cultivos sincronizados en la oscuridad durante 16 h y transferidos a medios con nitrato amónico 4 mM en la luz.

C. Células de cultivos sincronizados después de 6 h en la condición B se transfirieron a medios nuevos con nitrato amónico 4 mM para valorar la actividad de excreción de nitrito.

D. Células de cultivos sincronizados después de 24 h en la condición B se transfirieron a medios nuevos con nitrato amónico 4 mM para valorar la actividad de excreción de nitrito.



A pesar de que la estirpe  $23c^+$  tenía un fenotipo  $Nit^+$  en medios sólidos (Fig.30), se realizaron curvas de crecimiento en medio líquido, con diferentes fuentes de nitrógeno y tanto en luz continua como en ciclos de luz/oscuridad (Fig.31). En luz continua, la estirpe  $23c^+$  sigue siendo CRA mientras que la estirpe Tx11-8 era CSA (Fig.31A, A1 y A2); pero curiosamente la estirpe  $23c^+$  no crecía en medios con nitrato (Fig.31A y A2). En ciclos de luz/oscuridad, la estirpe  $23c^+$  sí podía crecer en nitrato (Fig.31B y B2) con una tasa de crecimiento igual a la observada en medios con amonio (Fig.31B y B2). Este efecto de la luz en la estirpe  $23c^+$  era específico para el crecimiento en nitrato y no parecía afectar al crecimiento en nitrito (Fig. 31A).

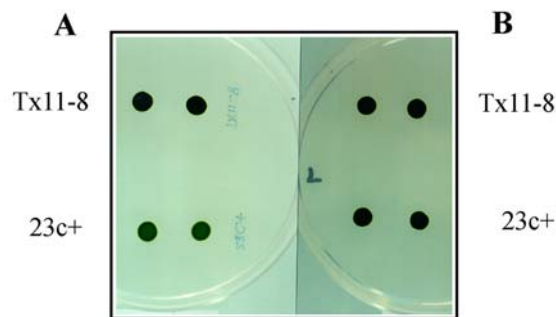


Fig.30. Crecimiento de las estirpes Tx11-8 y  $23c^+$  en medios sólidos con nitrato 4 mM, en luz continua (A) o en cultivos sincrónicos (12 h luz/ 12 h oscuridad) (B). Cada estirpe está representada por duplicado.

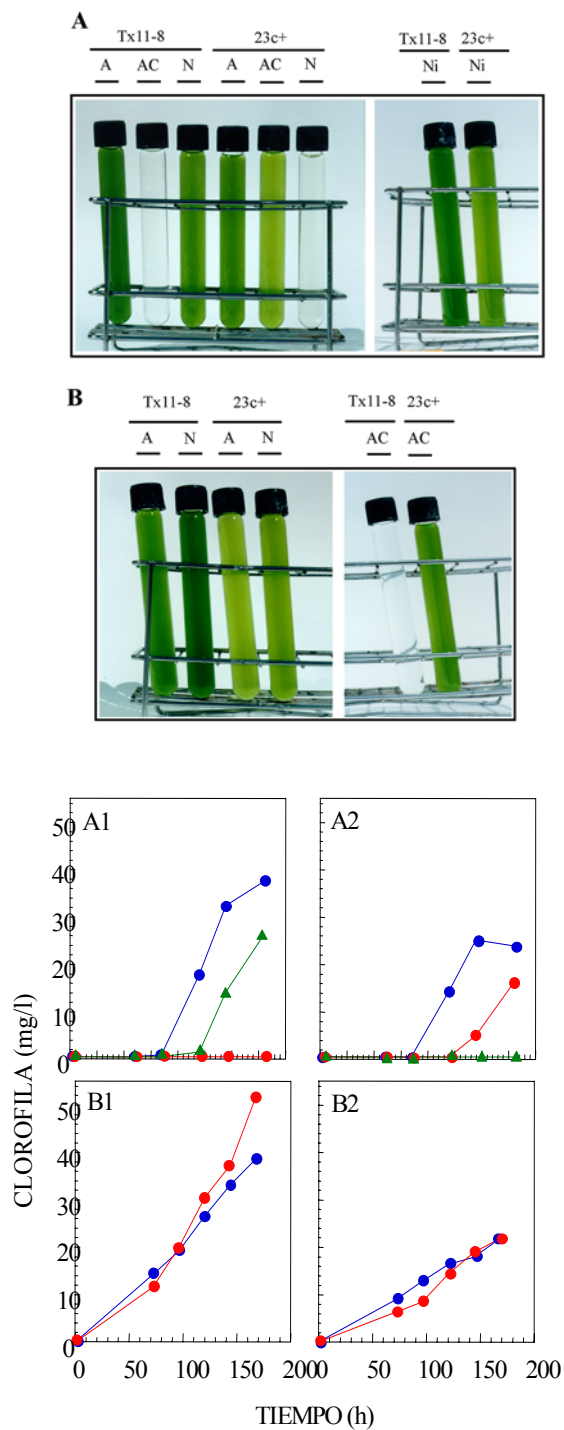


Fig.31. Crecimiento de las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup> en medios líquidos en diferentes medios y en condiciones de luz continua o sincronizadas.

A. Células en luz continua cultivadas en amonio 8 mM (A), amonio 8 mM + clorato 10 mM (AC), nitrato 4 mM (N) o nitrito 2 mM (Ni). B. Células cultivadas en condiciones de cultivos sincronizados en amonio 8 mM (A), amonio 8 mM + clorato 10 mM (AC), en nitrato 4 mM (N).

A1. Células de la estirpe Tx11-8 cultivadas en luz continua en A (●), AC (●) o N (▲).

A2. Células de la estirpe 23c<sup>+</sup> cultivadas en luz continua en A (●), AC (●) o N (▲).

B1. Células de la estirpe Tx11-8 cultivadas de forma sincrónica en A (●) o N (●).

B2. Células de la estirpe 23c<sup>+</sup> cultivadas de forma sincrónica en A (●), o N (●).

Los datos sugieren que, en la estirpe 23c<sup>+</sup>, la mutación que confiere CRA está relacionada con un proceso de adaptación a la luz y afecta fundamentalmente al crecimiento en nitrato. Se evaluaron las siguientes posibilidades para explicar este efecto. Primero, que en la estirpe 23c<sup>+</sup> se habían producido mutaciones que afectan a factores reguladores de la actividad del promotor *Cab*. Una expresión alterada del promotor *Cab* llevaría a una disminución de la actividad fotosintética y a un crecimiento reducido (medido como aumento en clorofila) en cualquier medio (Escoubas et al., 1995). Esta hipótesis se desestimó porque el efecto de la luz era específico en medios con nitrato y porque la actividad fotosintética medida como producción de O<sub>2</sub> era comparable en las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup> en medios con nitrato (Tabla XVII).

Tabla XVII. Actividad fotosintética en las estirpes Tx11-8 y 23c<sup>+</sup> en diferentes medios y condiciones de cultivo.

Las medidas de actividad fotosintética se llevaron a cabo en un electrodo de O<sub>2</sub>, según se describe en Materiales y Métodos. Los cultivos de células adaptadas a la luz proceden de células de amonio que fueron transferidas a medios con nitrato 4 mM durante 24h. Los cultivos de células sincronizadas, se tomaron a las 6 h de iniciarse el ciclo de luz. (ND) no determinada

Estirpe	Medios de cultivo	Cultivos de células adaptadas a la luz (μmol O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> mg Prot <sup>-1</sup> )	Cultivos de células sincronizadas (μmol O <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> mg Prot <sup>-1</sup> )
Tx11-8	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,46	1,16
Tx11-8	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ND	0,98
Tx11-8	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,87	0,40
23c <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	2,32	0,80
23c <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ND	0,70
23c <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,0	0,42

La segunda hipótesis que se planteó era que en la estirpe 23c<sup>+</sup>, la mutación que confiere CRA debía afectar a factores que regulan la asimilación de nitrato, en relación a la entrada por los HANT y que es esencial durante el periodo de adaptación a la luz continua en medios con nitrato para poder dar lugar a un crecimiento continuado en esta condición. Así pues, en la estirpe 23c<sup>+</sup>, la entrada y reducción de nitrato puede considerarse normal sólo hasta las 8 h (aproximadamente el tiempo de generación), pero después ni el clorato entraría eficientemente dando un fenotipo de CRA ni el nitrato dando un fenotipo Nit<sup>-</sup>.

Se han descrito y caracterizado canales iónicos regulados por luz, la bacteriorodopsina un canal de  $H^+$ , y la halorodopsina un canal de cloruro, que muestran una alta homología (Mathies et al., 1991; Rüdiger y Oesterhelt, 1997). En *Arabidopsis thaliana*, la mutación *Chl1* que confiere resistencia a clorato conlleva a una disminución de transporte de nitrato y de cloruro (Tsay et al., 1993). En *Monoraphidium braunii* se ha descrito actividad de canales iónicos ( $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ ) que muestran un mismo patrón de regulación por luz azul (Aparicio et al., 1994; Witt y Aparicio, 1995; Quiñones et al., 1997).

Sobre estas premisas, se procedió a determinar la participación de canales de cloruro en la asimilación de nitrato en *C. reinhardtii*. En test de crecimiento en placas se observó que las estirpes CSA (Tx11-8 y NRcG1) el cloruro 50 mM protegía eficientemente de la toxicidad del clorato (Fig.32). También el NPPB, un inhibidor de canales de cloruro protegió de la toxicidad del clorato (Fig.33).

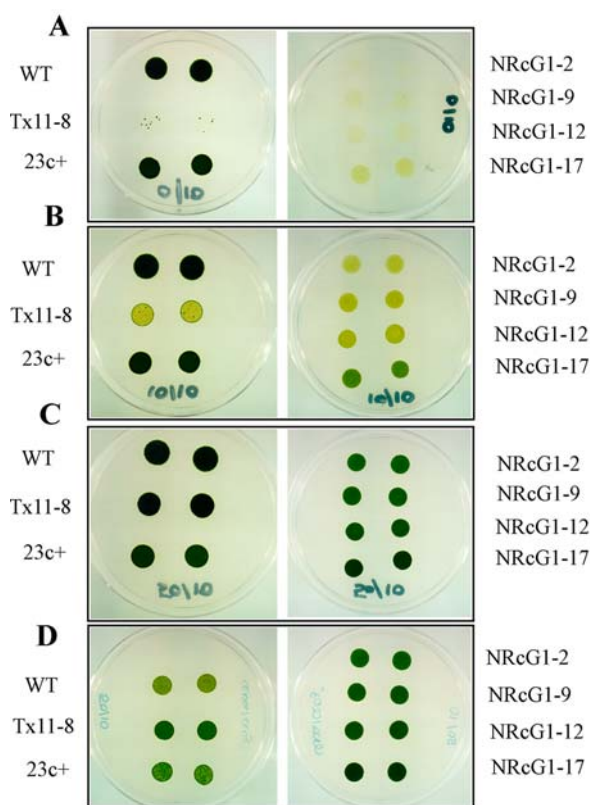


Fig.32. Análisis del efecto protector del  $Cl^-$  frente a la toxicidad del clorato en las estirpes Tx11-8, 23c<sup>+</sup> y NRcG1-(2, 9, 12 y 17) en medios con amonio.

- A. Crecimiento de las estirpes con  $(NH_4)_2SO_4$  8 mM y  $KClO_3$  10 mM.
  - B. Crecimiento de las estirpes con  $(NH_4)_2SO_4$  8 mM,  $KClO_3$  10 mM y  $KCl$  10 mM.
  - C. Crecimiento de las estirpes con  $(NH_4)_2SO_4$  8 mM,  $KClO_3$  10 mM y  $KCl$  50 mM.
  - D. Crecimiento de las estirpes con  $(NH_4)_2SO_4$  8 mM,  $KClO_3$  10 mM y  $NaCl$  50 mM.
- Cada estirpe está representada por duplicado.

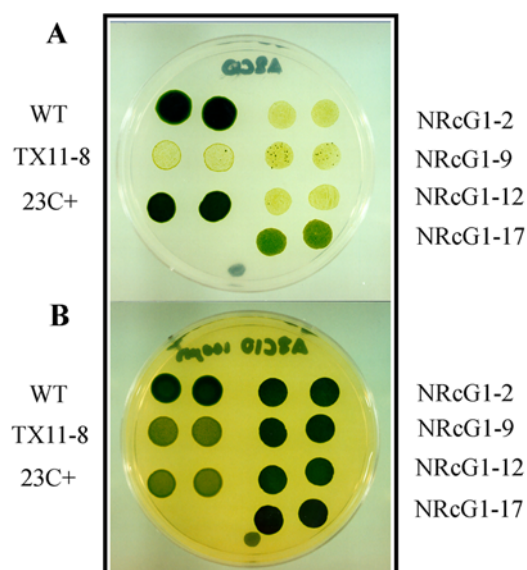


Fig.33. Efecto del inhibidor NPPB en el crecimiento de las estirpes silvestre, Tx11-8, 23c<sup>+</sup> y NRcG1-(2, 9,12,17).

Análisis del crecimiento en gota en medios sólidos que contenían sulfato amónico 8 mM y clorato 10 mM, en ausencia (A) o presencia del inhibidor NPPB 100 μM (B). Cada estirpe está representada por duplicado.

Se determinó la actividad de excreción de nitrito a partir de nitrato en estirpes CSA que portan los HANT (Tx11-8), y en estirpes que carecen de estos sistemas de transporte (NRcG1) en las condiciones indicadas en la figura 34. Las células crecidas en medios con amonio y adaptadas a la luz se transfirieron a medios con nitrato 4 mM más sulfato amónico 4 mM, determinándose el efecto del cloruro y del inhibidor NPPB en la actividad de excreción de nitrito. La estirpe Tx11-8 mostraba una cinética bifásica en la excreción de nitrito. Primero, una cinética rápida hasta 1,30 h que no se afectaba por la presencia del inhibidor NPPB pero que se inhibía por cloruro 8 mM; y después de 3 h otra más lenta, que se inhibía por NPPB y no se afectaba por cloruro. La estirpe NRcG1-2 que carece de los sistemas HANT, mostró únicamente el segundo componente de excreción de nitrito a partir de las 3 h, pero que a diferencia de la estirpe Tx11-8, se inhibió parcialmente tanto por cloruro como por NPPB (Fig.34).

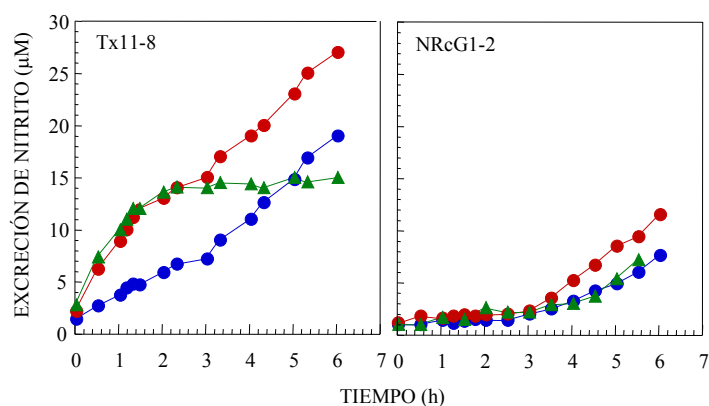


Fig.34. Efecto del cloruro y del inhibidor NPPB en la excreción de nitrito al medio en las estirpes Tx11-8 y en el mutante (Nii<sup>-</sup>/HANT) NRcG1-2.

Células adaptadas a la luz y cultivadas en medios con amonio fueron transferidas a un medio con nitrato 4 mM más (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mM (●), en presencia de KCl 8mM (●), o NPPB 100 µM (▲).

Recientemente en *C. reinhardtii*, se ha descrito la existencia de un sistema de transporte que permite la entrada eficiente de nitrito, que se bloquea por cloruro, pero no por amonio, y que se expresa en condiciones limitantes de carbono (Rexach et al., 1998). Las características de este transportador, puesto que no se bloquea por amonio, podría dar cuenta del fenotipo de CSA.

## DISCUSIÓN

El estudio de estirpes de *C. reinhardtii* que portan la NR constitutiva nos ha permitido una mejor comprensión de la regulación de la ruta de asimilación de nitrato. Primero, hemos mostrado que la actividad NR tiene un papel regulador sobre su propia expresión y sobre la de los HANT. El papel autoregulador de la NR transcripcionalmente se deduce del patrón de expresión diferencial de *Nia1* según, se parta de condiciones en las que no hay NR, i.e. de oscuridad, o de condiciones en las que ya existe cierta expresión de NR (Fig.17). El papel regulador de la NR sobre la expresión de los HANT se recoge en las figuras 15, 16 y 17, y tendría lugar en el sentido siguiente. Cuando no hay actividad NR (i.e. en amonio y oscuridad), la respuesta a la señal de nitrato es óptima, lo que conduce a la expresión de cantidades elevadas y mantenidas con el tiempo de los transcritos de *Nia1*, *Nrt2;1* y *Nar2*. En cambio, cuando ya se parte de ciertos valores de NR, hay un efecto negativo sobre las cantidades acumuladas de los transcritos de *Nia1*, *Nrt2;1* y *Nar2* que se obtienen en respuesta a la señal de nitrato, no siendo ni tan altos ni mantenidos con el tiempo. Los datos concuerdan con los obtenidos en los mutantes de NiR, en este trabajo, que demuestran que al igual que en plantas esta regulación se debe a la actividad NR. Si bien, la interpretación es bastante diferente. En el caso de plantas, parece ser que la glutamina, el metabolito derivado de la asimilación del nitrato, tiene una función reguladora negativa (Deng et al., 1991; Shiraishi et al., 1992). En el caso de *C. reinhardtii* proponemos que es el nitrito, producto directo de la reducción del nitrato, el que regula negativamente la expresión NR y de HANT.

En segundo lugar, los datos presentados muestran que la NR constitutiva permite la expresión/actividad de los transportadores de nitrato y nitrito en condiciones en que estos no deberían ser operativos, es decir, en presencia de amonio. Que permita la actividad de los HANT se demuestra en los valores de actividad mostrados en la figura 15, en donde se recoge la actividad de excreción de nitrito por la estirpe Tx11-8 a partir de nitrato y en presencia de amonio, a concentraciones de nitrato en las que éste sólo puede entrar en la célula por los HANT. El hecho de que no se pudiera demostrar la presencia de transcrito de *Nrt2;1/Nar2* en medios con nitrato y amonio, ni siquiera por el ensayo de protección de ribonucleasas (Fig.16), y que la actividad de los HANT se bloquee por amonio (Galván et al. 1996; Prieto, 1993), está de acuerdo con los valores muy bajos de expresión/actividad de estos HANT en estas condiciones en la estirpe Tx11-8. Una explicación de estos hechos es que las estirpes silvestres de *C. reinhardtii* también expresen cantidades basales de los HANT en medios con amonio. Sin embargo, la diferencia con la estirpe Tx11-8 sería que en la estirpe silvestre una posible expresión basal de la

NR y NiR estaría sincronizada (Fernández et al. 1998). En cambio, en la estirpe Tx11-8 la expresión de la NR en medios con amonio, bajo control del promotor *CabII-1*, permitiría reducir el poco nitrato que entre por los HANT en estas condiciones. Pero al estar completamente desbalanceada las cantidades de NiR a favor de la NR, el nitrito generado se excretaría al medio. Esta falta de coregulación NR/NiR parece existir en la estirpe Tx11-8 ya que no se ha demostrado un aumento de la actividad NiR en medios con nitrato y amonio (Prieto, 1993).

La expresión de NR constitutiva desregula además la expresión/actividad de los LANT/(HANiT?) según se demuestra en las estirpes NRcG1. Estas estirpes carecen de los genes para los HANT y por tanto, de la actividad correspondiente (Fig.19A), aunque tienen actividad LANT que permite la entrada de nitrato a altas concentraciones (Figs.19B,C,D). En *C. reinhardtii* se han descrito diferentes sistemas HANiT, uno es el biespecífico de nitrato/nitrito codificado por *Nrt2;1/Nar2* (Galván et al., 1996), del que carecen las estirpes NRcG1, y otro parece estar codificado por *Nrt2;3* (Quesada et al., 1998b). Las características de este segundo HANiT son: 1) está bajo control del gen regulador *Nit2* (Quesada et al., 1998b); 2) se reprime y se bloquea por amonio (Quesada et al., 1998b; Rexach et al., 1998); 3) requiere la señal de nitrato para su óptima expresión; y 4) opera a concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (Rexach et al., 1998). Las características de regulación de este HANiT/(LANT?) son parecidas a las de *Nrt2;1/Nar2*. Si bien, el hecho de que en las estirpes NRcG1, se observe una inhibición parcial por amonio en la actividad de LANT (Fig.20) indica que la presencia de una NR constitutiva desregula también la actividad de este transportador.

Finalmente, que la presencia de una NR constitutiva permita la expresión/actividad de otros transportadores para el cuál el cloruro sería un sustrato, lo demuestra el hecho de que tanto el cloruro como el inhibidor de canales de cloruro NPPB protege de la toxicidad por clorato en las estirpes Tx11-8 y NRcG1 (Figs.33 y 34). El fenotipo CRA en las estirpes silvestre indica que este sistema no es operativo en presencia de amonio si no hay una NR constitutiva.

En *Monoraphidium braunii*, se han descrito actividades de transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup> que muestran un comportamiento similar (Aparicio y Quiñones, 1991; Aparicio et al., 1994; Quiñones et al., 1997). Los datos de afinidad por el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup> así como la inhibición competitiva del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre el transporte de Cl<sup>-</sup>, o del Cl<sup>-</sup> sobre el transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> parecen indicar que tanto el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como el Cl<sup>-</sup> son transportados por el mismo sistema de transporte (Aparicio et al. 1994; Witt y Aparicio, 1995; Quiñones et al., 1997). La situación en *C. reinhardtii* es diferente en el sentido de que existen múltiples sistemas de transporte. Así, existen dos HANT (*Nrt2;1/Nar2* y *Nrt2;2/Nar2*), que son los responsables del transporte eficiente de nitrato y crecimiento en medios con nitrato, (Quesada et al., 1993; Quesada et al., 1994; Galván et al.,



1996) y, tres HANiT, uno sería *Nrt2;1/Nar2* (Galván et al., 1996), otro parece ser *Nrt2;3* (Quesada et al., 1998b; Rexach et al., 1998) y el tercero, cuyo gen aún no se ha clonado, parece ser también un transportador de Cl<sup>-</sup> (Rexach et al., 1998). Los datos presentados en este trabajo indican que si bien este transportador de Cl<sup>-</sup> es independiente genéticamente de los HANT, sí parece esencial para la regulación de estos y para permitir el crecimiento en nitrato, como se discute más adelante. Las características de este tercer HANiT son: 1) opera a concentraciones limitantes de CO<sub>2</sub>; 2) no requiere la señal de nitrato para su óptima expresión y; 3) no se bloquea por amonio pero sí por Cl<sup>-</sup> y NPPB (Rexach et al., 1998). El hecho que esta actividad de transporte no se bloquee por amonio indica que éste podría ser el factor determinante de la CSA en las estirpes Tx11-8 y NRcG1.

La caracterización de estirpes CRA-Tx11-8 ha permitido aclarar algunos puntos acerca de la interrelación entre la NR constitutiva y la regulación de los transportadores. De 75 estirpes CRA sólo una (23c<sup>+</sup>) tenía cantidades de MoCo y actividad NR comparables a la estirpe parental Tx11-8. El resto de las estirpes, o bien no tenían MoCo y por tanto eran Nit<sup>-</sup> (45 estirpes) o bien tenían valores de MoCo significativamente disminuidos aunque eran Nit<sup>+</sup> (Tabla IX). Puesto que la cantidad de Moco parece ser un factor limitante para la expresión de una NR total (Solomonson y Barber, 1990; Savidov et al., 1997), nuestros resultados indican que hay una relación entre la actividad NR constitutiva y el fenotipo de CSA. Además, la proporción tan elevada con la que aparecen mutantes de MoCo en las estirpes CRA indica que ésta es una buena estrategia para la identificación de genes de la biosíntesis del MoCo. De hecho, tres de las estirpes analizadas (13b<sup>-</sup>, 4c<sup>-</sup> y 20c<sup>-</sup>) parecen estar afectadas en genes diferentes a los previamente identificados para la biosíntesis del MoCo en *C. reinhardtii* (Fernández et al., 1998)

En plantas, la expresión de NR constitutiva bajo control del promotor 35S (Nussaume et al., 1991) o bien bajo control del promotor CabII (Kaye et al., 1997) confiere un fenotipo de CSA que se ha usado como marcador seleccionable de estirpes transformantes que portan el gen quimérico. Si bien la actividad NR sería uno de los factores que confieren sensibilidad a clorato, nuestra idea en *C. reinhardtii* es que no es ni el único factor ni el más importante (Prieto y Fernández, 1993). Idea que se está haciendo también extensiva a plantas (Mackown et al., 1996). La actividad de transportadores a través de los cuales el clorato podría entrar en la célula sería el primer paso clave para la toxicidad a clorato. De hecho, la estrategia de obtención de mutantes resistentes a clorato está siendo utilizada para la obtención de mutantes afectados en los sistemas de transporte en plantas. Así, en *Arabidopsis*, se ha descrito el mutante Chl1 afectado en el transporte de nitrato de baja afinidad que también está alterado en el transporte de Cl<sup>-</sup> (Tsay et al., 1993); y mutantes de los sistemas de HANT (Wang y Crawford, 1996).

La evaluación de los transportadores en las estirpes CRA-Tx11-8, indicaba que en todas ellas el sistema *Nrt2;1/Nar2* era funcional. Lo que se demostraba, por la presencia de los correspondientes transcritos en Northern (Fig. 23), por las actividades de transporte de nitrato en las estirpes  $\text{Nit}^+$  (Fig. 24), y por la inhibición por nitrato en el transporte de nitrito en las estirpes  $\text{Nit}^+$  y  $\text{Nit}^-$  (Tablas XV y XVI). Se ha descrito que el sistema *Nrt2;1/Nar2* se inhibe por clorato (Galván et al., 1996), un resultado a resaltar es que en ninguna de las estirpes CRA-Tx11-8 se observó inhibición por clorato del transporte de nitrito (Tablas XV y XVI) y que, de manera general, en las estirpes  $\text{Nit}^+$  CRA-Tx11-8 del grupo 3 y 4 hubo incluso una activación apreciable por clorato de dicha actividad. Estos datos apuntan a que la inhibición por clorato del sistema *Nrt2;1/Nar2* tenga lugar de modo indirecto a través de sistema(s) de transporte no operativos en las estirpes silvestres.

De entre las estirpes CRA-TX11-8, la más interesante fue la  $23c^+$ . Dicha estirpe no mostraba diferencias con respecto a la estirpe parental en cuanto a las actividades de NR, MoCo (Tabla IX), HANT (Fig.25) y HANiT (Fig.26). Si bien, sí se encontraron diferencias en cuanto al efecto de la luz continua sobre: 1) la expresión de la actividad *CabII-1-NR* en medios con amonio (Figs.27A y B; 28A); 2) la actividad de excreción de nitrito a partir de nitrato en medios con amonio (Fig.29) y; 3) el crecimiento en nitrato (Fig.31). La caracterización de esta estirpe demostraba que estaba afectada en un factor necesario para el crecimiento mantenido en medios con nitrato en luz continua (Fig.31). Esta mutación es la que le conferiría el fenotipo de CRA ya que, tras un periodo de adaptación a la luz, esta estirpe no transporta eficientemente el nitrato/clorato (Fig. 29).

El aislamiento de este tipo de mutantes resistentes a clorato y afectados en la regulación por luz de la NR se ha obtenido también en *Arabidopsis* (Lin y Chen, 1997). En el caso de *Arabidopsis*, el locus afectado se ha denominado CR88 y se postula que es un componente de la ruta de transducción de señales mediada por fotoreceptores. Este mutante CR88 está afectado en la regulación por luz de NR2, CAB y RBCS pero no en la expresión de NR1. En nuestro caso, la mutación en la estirpe  $23c^+$  afectó significativamente sólo al crecimiento con nitrato y, al menos tras 24 h en medios con nitrato no tenía efecto sobre la actividad fotosintética con respecto a la estirpe parental en las mismas condiciones (Tabla XVII).

Nuestra hipótesis es que la estirpe  $23c^+$  está afectada en la actividad de algún canal iónico/ $\text{Cl}^-$ , posiblemente regulado por luz y que es esencial para el crecimiento en nitrato con luz continua. En este sentido, hay que considerar que en *C. reinhardtii* se han aislado mutantes sensibles a la luz. Independientemente de aquellos que están afectados en el PSI, ATP sintetasa y mutantes afectados en la fase oscura de la fotosíntesis (Spreitzer y Mets, 1981; Spreitzer y Ogren

1983) que requieren acetato para crecer, también se han aislado mutantes sensibles a la luz que no requieren acetato y que muestran unos fenotipos muy particulares. El mutante *SacI* tiene un fenotipo de sensibilidad a la luz específico para la asimilación de P y S (Davies et al., 1998). El mutante *ycf10* también es sensible a la luz y es específico para la asimilación de carbono inorgánico, cuando las células se adaptan a bajo CO<sub>2</sub> (Rolland et al., 1998). Curiosamente, los genes afectados en estos mutantes que están relacionados con la asimilación de macronutrientes, corresponden a *SacI* que codifica para una proteína de membrana con características de transportadores iónicos cuya función se desconoce (Davies et al., 1998) y *Ycf10* que codifica para una proteína de transporte de CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> al cloroplasto (Rolland et al., 1998).

En las estirpes Tx11-8 y NRcG1, los datos indican que existe un transportador de Cl<sup>-</sup> por el que el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/clorato podría entrar, confiriendo CSA (Figs.32, 33 y 34). La participación de canales de Cl<sup>-</sup> regulados por luz azul parece ser importante en la regulación de procesos fisiológicos tales como la apertura de estomas, la respuesta al fototropismo en plantas (Cho y Spalding, 1996), el mantenimiento de la osmolaridad en *Halobacterium salinarum* (Rüdiger y Oesterheld, 1997) y, la asimilación de nitrato en *Monoraphidium brauni* (Witt y Aparicio, 1995; Quiñones et al., 1997). Finalmente, la clonación de este hipotético canal de Cl<sup>-</sup> en *C. reinhardtii* y la demostración de su ausencia en la estirpe 23c<sup>+</sup> aclarará inequívocamente su participación en la asimilación de nitrato.

**CONCLUSIONES**

1. La ausencia de NiR en *C. reinhardtii* no desregula la expresión de NR ni de los HANT. Es la actividad NR quién juega este papel regulador
2. Se propone que el nitrito como producto directo de la actividad NR, es un metabolito regulador negativo sobre la expresión de los genes *Nia1*, *Nrt2;1* y *Nar2*
3. En los mutantes de NiR, se demuestra que existen sistemas de LANT, así como sistemas eficientes para exportar el nitrito de la célula, independientes de *Nrt2;1/Nar2*
4. En los mutantes de HANT (S10 y M4), se demuestra que existen al menos dos señales positivas del nitrato para la expresión/actividad de la NR. Una que es sentida extracelularmente y que da cuenta de la expresión de transcrito de *Nia1* y, otra que es sentida intracelularmente y que actúa postrascriptionalmente
5. La expresión de NR de forma constitutiva en medios con amonio permite la expresión/actividad de los HANT, HANiT (LANT) y de un posible transportador de cloruro (LANT/HANiT)
6. La estirpe 23c<sup>+</sup> está afectada en un gen cuya expresión es esencial para el crecimiento mantenido en nitrato en condiciones de luz continua, y que posiblemente está relacionado con el transporte de cloruro

## **REFERENCIAS**

- Aberg B (1947) On the mechanism of the toxic action of chlorate and some related substances upon young wheat plants. *Ann Rev Agric Coll Sweden* **15**, 37-107
- Aguilar M (1991) Biosíntesis y caracterización físico-Química del cofactor de molibdeno de algas verdes. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba
- Aguilar MR, Prieto R, Cárdenas J, Fernández E (1992a) nit 7: a new locus for molybdopterin cofactor biosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **98**, 395-398
- Aguilar M, Kalakoutskii K, Cárdenas J, Fernández E (1992b) Direct transfer of molybdenum cofactor to aponitrate reductase from a carrier protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **307**, 162-163
- Aparicio PJ, Quiñones MA (1991) Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiol* **95**, 374-378
- Aparicio PJ, Witt FG, Ramírez JM, Quiñones MA, Baladín T (1994) Blue-light-induced pH changes associated with NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup> uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant Cell Environ* **17**, 1323-1330
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-15
- Back E, Burkhardt W, Moyer M, Privalle L, Rothstein S (1988) Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. *Mol Gen Genet* **212**, 20-26
- Bellisimo DB, Privalle LS (1995) Expression of nitrite reductase in *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of predicted active site amino acids. *Arch Biochem Biophys* **323**, 155-163
- Bestor TH (1998) Methylation meets acetylation. *Nature* **393**, 311-312
- Bisen PS, Shanthy S (1992) Physiological and Biochemical Characterization of Chlorate-Resistant Mutants of *Anabaena doliolum*. *Curr Microbiol* **25**, 353-357
- Blankenship E, Kindle K (1992) Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: A *cabII-1/nit 1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1 nit2* strain. *Mol Cell Biol* **12**, 5268-5279
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua NH (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method to the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Caboche M, Rouzé P (1990) Nitrate reductase a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet* **6**, 187-192

- Campbell WH, Kinghorn JR (1990) Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem Sci* **15**, 315-319
- Cerutti H, Johnson AM, Gillham NW, Boynton JE (1997) Epigenetic silencing of foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **9**, 925-945
- Cho MH, Spalding EP (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8134-8138
- Cole JA (1989) Physiology, biochemistry, and genetics of nitrite reduction by *Escherichia coli*. In *Molecular and Genetic Aspects of Nitrogen Assimilation*. (Wray JL, Kinghorn JR, eds). Oxford Univ Press, Oxford, pp 229-243
- Conway HJ (1962) *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 5<sup>a</sup> ed pp, 105-110. Crosby Lockwood. London
- Cove DJ (1976) Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. Studies of mutants altered in nitrate assimilation. *Mol Gen Genet* **146**, 147-159
- Cove DJ (1979) Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol Rev* **54**, 291-327
- Crawford NM, Arst HN (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Ann Rev Plant Genet* **27**, 115-146
- Crawford NM, Campbell WH, Davis RW (1986) Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8073-8076
- Crawford NM (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-868
- Creté P, Caboche M, Meyer C (1997) Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **11**, 625-634
- Dalling MJ, Tolbert NE, Hageman RH (1972) Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. *Biochem Biophys Acta* **283**, 505-512
- Davies J, Yildiz F, Wykaff D, Grossman A (1998) Sensing, signaling and surviving sulfur stress. 8<sup>th</sup> International Conference on The Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*. Tahoe City, California, Abstrat 26
- Deane-Drummond C (1984) Nitrate transport into *Chara corallina* cells using  $^{36}\text{ClO}_3^-$  as an analogue for nitrate. I. Interaction between  $^{36}\text{ClO}_3^-$  and  $\text{NO}_3^-$  and characterization of  $^{36}\text{ClO}_3^-/\text{NO}_3^-$  influx. *J Exp Bot* **35**, 1289-1298
- Debuchy R, Purton S, Rochaix JD (1989) The argininesuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J* **10**, 2803-2809



- Deng M, Moureaux T, Caboche M (1989) Tungstate, a molybdate analogue inactivating nitrate reductase, deregulates the expression of the nitrate reductase structural gene. *Plant Physiol* **91**, 304-309
- Doddema H, Telkamp GP (1979) Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. *Physiol Plant* **45**, 332-338
- Duncanson E, Gilkes AF, Kirk DW, Sherman A, Wray JL (1993) *nir-1*, a conditional lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. *Mol Gen Genet* **236**, 275-282
- Dunn-Coleman NS (1984) Biochemical characterization of the molybdenum cofactor mutants of *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **8**, 581-588
- Ebersold WT (1967) *Chlamydomonas reinhardtii*: heterozygous diploid strains. *Science* **157**, 447-449
- Escoubas JM, Lomas M, Laroche J, Falkowski PG (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signalled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10237-10241
- Faure JD, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M (1991) Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant J* **1**, 107-113
- Fernández E, Cárdenas J (1981) In vitro complementation of an assimilatory nitrate reductase from mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **657**, 1-12
- Fernández E, Cárdenas J (1982) Regulation of the nitrate-reducing system enzymes in wild type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **186**, 164-169
- Fernández E, Matagne RF (1984) Genetic analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **8**, 635-640
- Fernández E, Matagne RF (1986) In vivo complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **10**, 397-403
- Fernández E, Cárdenas J (1989) Genetic and regulatory aspects of nitrate assimilation in algae. En *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* (Wray JL, Kinghorn JR, eds) pp101-124. Oxford University Press. Oxford
- Fernández E, Schnell R, Ranum LPW, Hussey SC, Silflow CD, Lefebvre PA (1989) Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6449-6453
- Fernández E, Galván A, Quesada A (1998) Nitrogen assimilation and its regulation. En *Molecular Biology of Chlamydomonas: Chloroplast and Mitochondria* (Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont, Merchant S, eds). Kluwer Acad Publish, Netherlands (en prensa)
- Fischer P, Klein U (1988) Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **88**, 947-952

- Florencio FJ, Vega JM (1982) Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **21**, 1195-1200
- Florencio FJ, Vega JM (1983) Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. Photoproduction of ammonium. *Planta* **158**, 288-293
- Franco AR, Cárdenas J, Fernández E (1984) Heteromultimeric structure on the nitrate reductase complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **3**, 1403-1407
- Franco AR, Cárdenas J, Fernández E (1987) Involvement of reversible inactivation in the regulation of nitrate reductase enzyme levels in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **84**, 665-669
- Friemann A, Brinkmann K, Hachtel W (1992) Sequence of a cDNA encoding nitrite reductase from the tree *Betula pendula* and identification of conserved protein regions. *Mol Gen Genet* **231**, 411-416
- Fu YH, Marzluf GA (1988) Metabolic control and autogenous regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **170**, 655-661
- Galangau F, Daniel-Vedel F, Moureaux T, Dorbe MF, Leydecker MT, Caboche M (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from *tobacco* and tomato in relation to light-dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiol* **88**, 383-388
- Galván A, Córdoba F, Cárdenas J, Fernández E (1991) Regulation of nitrite uptake and nitrite reductase expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1074**, 6-11
- Galván A, Cárdenas J, Fernández E (1992) Nitrate reductase regulates expression of nitrite uptake and nitrite reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **98**, 422-426
- Galván A, Quesada A, Fernández E (1996) Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **271**, 2088-2092
- Garrett RH (1972) The induction of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* **264**, 481-489
- Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV Electrophysiology. *Plant Physiol* **99**, 456-463
- Goldschmidt-Clermont M, Rahire M (1986) Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol Biol* **191**, 421-432
- Gotor C, Pajuelo E, Romero LC, Márquez AJ, Vega JM (1990) Comparative immunological studies of ferredoxin-nitrite reductases and ferredoxin-glutamate synthases from photosynthetic organisms. *Arch Microbiol* **153**, 230-234

- Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* **32**, 169-204
- Guy M, Zabala G, Filner P (1988) The kinetics of chlorate uptake by XD tobacco cells. *Plant Physiol* **86**, 817-821
- Harris E (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook (Harris E., ed) Academic Press, New York
- Hawker KL, Montague P, Kinghorn JR (1992) Nitrate reductase and nitrite reductase levels in various mutants in *Aspergillus nidulans*: confirmation of autogenous regulation. *Mol Gen Genet* **231**, 485-488
- Herrera J, Paneque A, Maldonado JM, Barea JL, Losada M (1972) Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Biophys Res Commun* **84**, 996-1003
- Hoff T, Truong H-N, Caboche M (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell Environ* **17**, 489-506
- Huber Sc, Bachmann M, Huber JL (1996) Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca<sup>2+</sup> and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci* **1**, 432-438
- Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganism. *Proc Am Philos Soc* **94**, 152-170
- Imbault P, Wittemer C, Johannigmeier U, Jacobs JD, Howell SH (1988) Structure of the *Chlamydomonas reinhardtii cabII-1* gene encoding a chlorophyll a/b binding protein. *Gene* **73**, 397-407
- Johnstone IL, McCabe PC, Greaves P, Gurr SJ, Cole GE, Brow MAD, Unkles SE, Clutterbuck AJ, Kinghorn JR, Innis MA (1990) Isolation and characterisation of the *crna-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **90**, 181-192
- Jovin T, Charambach A, Naughton MA (1964) Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **9**, 351-364
- Kaiser WM, Spill D (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. *Plant Physiol* **96**, 368-375
- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E (1992) Adenine nucleotide are apparently involved in the light-dark modulation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* **186**, 236-240
- Kaye C, Crawford N, Malmberg RL (1997) Constitutive non-inducible expression of the *Arabidopsis thaliana Nia2* gene in two nitrate reductase mutants of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol* **33**, 953-964
- Kindle KL (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1228-1232

- Kinghorn JR, Campbell EI (1989) Amino acid sequence relationships between bacterial, fungal and plant nitrate reductase and nitrite reductase proteins. En *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* (Wray JL, Kinghorn JR, eds) pp 385-403. Oxford University Press. Oxford
- Kleinhofs A, Warner RL, Lawrence JM, Melzer JM, Jetre JM, Kudrna DA (1989) Molecular genetics of nitrate reductase in barley. En *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* (Wray JL, Kinghorn JR, eds) pp197-211. Oxford University Press. Oxford
- Kleinhofs A, Warner RL (1990) Advances in nitrate assimilation. En *The biochemistry of Plants* (Mifflin BJ, Lea PD, eds) vol. **16**, 89-120. Academic Press. San Diego
- Kolesnikov T, Schröder I, Gunsalus RP (1992) Regulation of *narK* gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum. *J Bacteriol* **174**, 7104-7111
- Kronenberger J, Lepingle A, Caboche M, Vaucheret H (1993) Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots. *Mol Gen Genet* **236**, 203-208
- Labrie ST, Wilkinson JQ, Crawford NM (1991) Effect of chlorate treatment on nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **97**, 873-879
- Labrie ST, Wilkinson JQ, Tsay YF, Feldmann KA, Crawford NM (1992) Identification of two tungstate-sensitive molybdenum cofactor mutants, *chl2* and *chl7*, of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **233**, 169-176
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **251**, 614-616
- Lahners K, Kramer V, Back E, Privalle L, Rothstein S (1988) Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase. *Plant Physiol* **88**, 741-746
- Levine RP, Ebersold WT (1960) The genetics and cytology of *Chlamydomonas*. *Annu Rev Microbiol* **14**, 197-216
- Lin Y, Cheng CL (1997) A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* Defines a New *HY* Locus. *Plant Cell* **9**, 21-35
- López-Ruiz A, Verbelen JP, Roldán JM, Díez J (1985) Nitrate reductase of green algae is located in the pyrenoid. *Plant Physiol* **79**, 1006-1010
- Luque I, Flores E, Herrero A (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher plant nitrite reductases. *Plant Mol Biol* **21**, 1201-1205
- Llamas A (1997) Aislamiento y caracterización de mutantes en el gen *Nit5* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Córdoba

- MacKown CT, Van Sanford DA, Rothwell CG (1996) Nitrate uptake and assimilation and chlorate tolerance of wheat. *Crop Sci* **36**, 313-318
- Mathies RA, Steven WL, Ames JB, Pollard WT (1991) From femtoseconds to biology: Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Ann Rev Biophys Chem* **20**, 491-518
- Matsui J, Takeda G, Ida S (1990) Molecular cloning and partial amino acid sequence of rice ferredoxin-nitrite reductase. *Agricul Biol Chem* **54**, 3069-3071
- Mckintosh C (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* **1137**, 121-126
- Melzer JM, Kleinhofs A, Warner RL (1989) Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol Gen Genet* **217**, 341-346
- Merchán F, Kindle KL, Llama MJ, Serra JL, Fernández E (1995a) Cloning and sequencing of the nitrate transport system from the thermophilic, filamentous cyanobacterium *Phormidium laminosum*: comparative analysis with the homologous system from *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol Biol* **28**, 759-766
- Merchán F, Prieto R, Kindle KL, Llama MJ, Serra JL, Fernández E (1995b) Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli* of the nitrite reductase gene from the filamentous, thermophilic cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Plant Mol Biol* **27**, 1037-1042
- Mifflin BJ (1974) The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. *Plant Physiol* **54**, 550-555
- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusococcin. *Curr Biol* **6**, 1104-1113
- Morris I, Syrett PJ (1963) The development of nitrate reductase in *chlorella* and its repression by ammonium. *Arch Microbiol* **47**, 32-41
- Nan X, Huck-Hui Ng, Johson CA, Laherthy CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389
- Nelson JAE, Lefebvre PA (1995) Targeted disruption of the *NIT8* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **15**, 5762-5769
- Nichols GL, Syrett PJ (1978) Nitrate reductase deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **15**, 5762-5769
- Niyögi KK, Björkman O, Grossman AR (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14162-14167

- Noji S, Nohno T, Saïto T, Taniguchi S (1989) The *narK* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. FEBS lett **252**, 139-143
- Nussaume L, Vincentz M, Caboche M (1991) Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics. Plant J (1991) **1**, 267-274
- Nussaume L, Vincentz M, Meyer C, Boutin JP, Caboche M (1995) Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. Plant Cell **7**, 611-621
- Omata T, Andriesse X, Hirano A (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942. Mol Gen Genet **236**, 193-202
- Pajuelo E, Borrero JA, y Márquez A (1993) Immunological approach to subunit composition of ferredoxin-nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Sci **95**, 9-21
- Paneque A, Del Campo FF, Ramírez JM, Losada M (1965) Flavin dinucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim Biophys Acta **109**, 79-85
- Paneque A, Losada M (1966) Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH<sub>2</sub> and NADPH<sub>2</sub>. Biochim Biophys Acta **128**, 202-204
- Pérez D, Gonzalez C, Avila J, Brito N, Siverio JM (1997) The *YNT1* gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes *YNII* and *YNR1* encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. Biochem J **321**, 397-403
- Pineda M, Cárdenas J (1988). Espectroscopía Ultravioleta-visible de Compuestos Biológicos. Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, Córdoba
- Pouteau S, Chèrel I, Vaucheret H, Caboche M (1989) Nitrate reductase mRNA regulation in *N. plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. Plant Cell **1**, 1111-1120
- Prieto R (1993) Mecanismos de regulación de la ruta de asimilación de nitrato en *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Prieto R, Fernández E (1993) Toxicity and mutagenesis by chlorate are independent of nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Gen Genet **237**, 429-438
- Prieto R, Dubus A, Galván A, Fernández E (1996) Isolation and characterization of two regulatory mutants for nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Gen Genet **251**, 461-471
- Privalle LS, Lahners KN, Mullins MA, Rothstein S (1989) Nitrate effects, nitrate reductase activity and nitrite reductase mRNA levels in maize suspension cultures. Plant Physiol **90**, 962-967
- Quesada A, Galván A, Schnell R, Lefebvre PA, Fernández E (1993) Five nitrate assimilation related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Gen Genet **240**, 387-394

- Quesada A, Fernández E (1994) Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **24**, 185-194
- Quesada A, Galván A, Fernández E (1994) Identificación of nitrate transporters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **5**, 407-419
- Quesada A, Krapp A, Trueman L, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG, Caboche M (1997) PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol Biol* **34**, 265-274
- Quesada A, Gómez I, Fernández E (1998a) Clustering of the nitrite reductase gene and a light-regulated gene with nitrate assimilation loci in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* (en prensa)
- Quesada A, Hidalgo J, Fernández E (1998b) Three *Ntr2* genes are differentially regulated in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **258**, 373-377
- Quiñones MA, Giráldez N, Witt FG, Aparicio PJ (1997) Incorporación de aniones monovalentes dependiente de luz azul en *Monoraphidium braunii*. En Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular (Vega JM, Aparicio PJ, Castillo F, Maldonado JM, eds) pp 387-402. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Ranum LPW, Thompson MD, Schloss JA, Lefebvre PA, Silflow CD (1988) Mapping flagellar genes in *Chlamydomonas* using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* **120**, 109-122
- Rexach J, Montero B, Fernández E, Galván A (1998) Identification of two new nitrite transporter systems in *Chlamydomonas reinhardtii* (manuscrito en preparación)
- Rochaix JD, Van Dillewijn J (1982) Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature* **296**, 70-72
- Rochaix JD (1987) Molecular genetics of chloroplasts and mitochondria in the unicellular green alga *Chlamydomonas*. *FEMS Microbiol Rev* **46**, 13-34
- Romero LC, Gotor C, Márquez AJ, Forde BG, Vega JM (1988) Antigenic similarities between ferredoxin-dependent nitrite reductase and glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Biophys Acta* **957**, 152-157
- Roldán JM, Verbellen JP, Buther WL, Tokuyasu K (1982) Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* **70**, 872-874
- Rolland N, Dorne AJ, Amoroso G, Sültermeyer DF, Joyard J, Rochaix JD (1997) Disruption of the plastidic *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J* **16**, 6713-6726
- Rüdiger M, Haupt U, Gerwert K, Oesterhelt D (1995) Chemical reconstitution of a chloride pump inactivated by a single point mutation. *EMBO J* **14**, 1599-1606

- Rüdiger M, Oesterhelt D (1997) Specific arginine and threonine residues control anion binding and transport in the light-driven chloride pump halorhodopsin. *EMBO J* **16**, 3813-3821
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning; A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Savidov NA, Tokarev BI, Lips SH (1997) Regulation of Mo-cofactor, NADH- and NAD(P)H-specific nitrate reductase activities in the wild type and two *nar*-mutants lines of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* **48**, 847-855
- Schnell RA, Lefebvre PA (1993) Isolation of the *Chlamydomonas* regulatory gene *nit2* by transposon tagging. *Genetics* **134**, 737-747
- Schloss JA, Silflow CD, Rosenbaum JL (1984) mRNA abundance changes during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **4**, 424-434
- Schoenmakers HCH, Koorneef M, Alefs SJHM, Gerrits WFM, Kop D van der, Chérel I, Caboche M (1991) Isolation and characterization of nitrate reductase-deficient mutants in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Mol Gen Genet* **227**, 458-464
- Scholten HJ, Feenstra WJ (1986) Uptake of chlorate and others ions in seedlings of the nitrate uptake mutant B1 of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum* **66**, 265-269
- Schuster C, Mohr H (1990) Appearance of nitrite reductase mRNA in mustard cotyledons is regulated by phytochrome. *Planta* **181**, 327-334
- Shanmugan KT, Boxer DH, Cole JA (1992) Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **6**, 3252-3254
- Shimogawara K, Fujiwara Sh, Grossman K, Usada H (1988) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* **148**, 1821-1828
- Shiraishi N, Sato T, Ogura N, Nakagawa H (1992) Control by Glutamine of Synthesis of Nitrate Reductase in Cultured Spinach Cells. *Plant Cell Physiol* **33**(6), 727-731
- Short T (1994) The transduction of blue light signals in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* **45**, 143-171
- Siddiqi MY, Glass AMD, Ruth TJ, Rufty TW (1990) Studies of the nitrate uptake system in barley I. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3^-$  influx. *Plant Physiol* **93**, 1426-1432
- Siddiqi MY, King BJ, Glass ADM (1992) Effects of nitrite, chlorate and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiol* **100**, 644-650
- Siverio JM, González C, Mendoza-Riquel A, Pérez MD (1993) Reversible inactivation and binding to mitochondria of nitrate reductase by heat shock in yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* **318**, 153-156



- Snell FD, Snell CT (1949) Colorimetric Methods of Analysis. Vol 2, 802-807. Van Nostrand. New York
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85
- Sodeinde OA, Kindle K (1993) Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9199-9203
- Solomonson LP, Barber MJ (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**, 225-253
- Sosa FM, Cárdenas J (1977) NADPH as electron donor for nitrate reduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z Pflanzenphysiol* **85**, 171-175
- Sosa FM, Ortega T, Barea JL (1978) Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* affected on their assimilation capability. *Plant Sci Lett* **11**, 51-58
- Spreitzer RJ, Mets L (1981) Photosynthesis deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotype. *Plant Physiol* **67**, 565-569
- Spreitzer RJ, Ogren WL (1983) Rapid recovery of chloroplast mutations affecting ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 6293-6297
- Stevens DR, Purton S (1994) Expression of foreign genes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* **45** (Suppl): 20
- Stevens DR, Rochaix JD, Purton S (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* **251**, 23-30
- Stöhr C, Glogan U, Mötschke M, Tischner R (1995) Evidence for the involvement of plasma membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila*. *Planta* **197**, 613-618
- Tamura G, Mosoi T, Aketagawa J (1978) Ferredoxin dependent sulphite reductase from spinach leaves. *Agric Biol Chem* **42**, 2165-2167
- Terzaghi WB, Cashmore AR (1995) Light regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**, 445-474
- Tischner R, Ward MR, Huffaker RC (1989) Evidence for a plasma-membrane-bound nitrate reductase involved in nitrate uptake of *Chlorella saccharophila*. *Planta* **178**, 19-24
- Trueman LJ, Richarson A, Forde BG (1996) Molecular cloning of higher plant homologues of the high affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* **175**, 223-231

- Tsay YF, Schroeder J, Feldman KA, Crawford NM (1993) A herbicide sensitive gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713
- Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn JR (1991) *Crna* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 204-208
- Vaucheret H, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M, Rouzé P (1989) Molecular cloning and characterization of the two homeologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol Gen Genet* **216**, 10-15
- Vaucheret H, Kronenberger J, Lépling A, Vilaine F, Boutin JP, Caboche M (1992) Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J* **2**, 559-569
- Vaughn K, Campbell WH (1988) Immuno-gold location of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol* **88**, 1354-1357
- Vega JM, Cárdenas J, Losada M (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods Enzymol* **69**, 255-270
- Vincentz M, Caboche M (1991) Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotina plumbaginifolia* plants. *EMBO J* **10**, 1027-1035
- Von Arb C (1990) Sulfur metabolism. C. Sulphite reductase. *Methods in Plant Biochem Vol. 3* (Lea PJ, ed) 345-348. London. Academic Press
- Wallsgrave RM, Hasegawa H, Kendall AC, Turner JC (1989) The genetics of nitrate uptake in higher plants. In *Molecular and Genetics Aspects of Nitrate Assimilation* (Wray JL, Kinghorn JR, eds) pp 15-26. Oxford Science Publications. Oxford
- Wang R, Crawford NM (1996) Genetic identification of a gene involved in constitutive high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9297-9301
- Ward MR, Tischner R, Huffaker RC (1988) Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. *Plant Physiol* **88**, 1141-1145.
- Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**, 833-844
- Watt DA, Amory AM, Creswell CF (1992) Effect of nitrogen supply on the kinetics and regulation of nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. *J Exp Bot* **43**, 605-615
- Wieneke J (1994) Use of a radio-labelled chloric anion ( $^{36}\text{ClO}_3^-$ ) as an analogue for tracking the nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) transport in higher plants. *J Plant Nutrition* **17**, 1671-1685
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1991) Identification of the *Arabidopsis* *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *Plant Cell* **3**, 461-471

- Witt FG, Aparicio PJ (1995a) Effects of short pulses of blue light on the alkalization associated with the uptake of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  by the green alga *Monoraphidium braunii* and related action spectra. *Photochem Photobiol* **61**, 619-626
- Witt FG, Aparicio PJ (1995b) Characterization of the blue-light-induced extracellular alkalization associated with the monovalent anion uptake by the green alga *Monoraphidium braunii*. Competition between  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$ . *Physiol Plant* **94**, 545-552.
- Wray JL, Kinghorn JR (1989) Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Oxford Science Publications. Oxford
- Wray JL, Fido RJ (1990) Nitrate reductase and nitrite reductase. *Methods in plant Biochemistry* Vol. **3**, 241-256, Academic Press, New York
- Zhang D, Lefebvre PA (1997) *FAR1*, a new negative regulatory locus required for the repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **146**, 121-133
- Zhou J, Kleinhofs A (1996) Molecular evolution of nitrate reductase genes. *J Mol Evol* **42**, 432-442
- Zumbrunn G, Scheider M, Rochaix JD (1989) A simple particule gun for DNA-mediated cell transformation. *Technique* **1**, 204-216
- Zumft WG (1972) Ferredoxin-nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. *Biochim Biophys Acta* **276**, 363-375