

Cristina Sarasa Buisán

Caracterización funcional del  
regulador FurC en *Anabaena* sp.  
PCC7120: bases moleculares,  
definición del regulón y  
consecuencias de su  
sobreexpresión en el exoproteoma  
y Exometaboloma

Director/es

Fillat Castejón, María Francisca  
Sevilla Miguel, Emma

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL  
REGULADOR FURC EN ANABAENA SP. PCC7120:  
BASES MOLECULARES, DEFINICIÓN DEL  
REGULÓN Y CONSECUENCIAS DE SU  
SOBREEXPRESIÓN EN EL EXOPROTEOMA Y  
EXOMETABOLOMA**

Autor

**Cristina Sarasa Buisán**

Director/es

Fillat Castejón, María Francisca  
Sevilla Miguel, Emma

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2022



# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Ciencias



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional del regulador FurC en *Anabaena* sp.  
PCC7120: bases moleculares, definición del regulón y consecuencias  
de su sobreexpresión en el exoproteoma y exometaboloma.**

Functional characterization of FurC from *Anabaena* sp. PCC7120:  
molecular basis, definition of the regulon and consequences of the  
overexpression in the exoproteome and exometabolome.

Memoria presentada por

**Cristina Sarasa Buisán**

Graduada en Biología, para optar al título de Doctora con mención  
internacional por la Universidad de Zaragoza

Mayo 2022



María Francisca Fillat Castejón, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Emma Sevilla Miguel, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

#### CERTIFICAN

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada “Caracterización funcional del regulador FurC (PerR) de *Anabaena* sp. PCC7120: bases moleculares, definición del regulón y consecuencias de su sobreexpresión en el exoproteoma y el exometaboloma” presentada por Cristina Sarasa Buisán, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y en el Instituto de Biocomputación y Física de los Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza y que reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctora con mención internacional por la Universidad de Zaragoza.

Para que así conste, se firma la presente en Zaragoza, a 06 de Mayo de 2022.

Fdo: María F. Fillat Castejón

Fdo: Emma Sevilla Miguel



*A mi padre*



## Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a todas las personas que con su apoyo y ayuda han hecho posible la realización y presentación de esta memoria

A mis directoras, María Fillat y Emma Sevilla, por ofrecerme la oportunidad de aprender y trabajar en su grupo de investigación. Gracias por vuestra dedicación, paciencia y apoyo constante durante este tiempo y sobre todo por brindarme vuestras más valiosas experiencias y conocimientos. A María agradecerte en especial tu sentido crítico y constructivo del que tanto he aprendido. Gracias también por el entusiasmo y la confianza que me has transmitido para investigar nuevos frentes y realizar colaboraciones. A Emma, en especial gracias por aportarme esa visión práctica desde el principio que tanto me ha ayudado, gracias por las intensas y entretenidas discusiones de resultados y sobre todo, gracias por tu cercanía y la seguridad que me has aportado durante este camino.

A Marisa Peleato por su generosidad y asesoramiento científico y personal durante toda la tesis doctoral. Gracias por inspirarme y transmitirme en todo momento el consejo más adecuado. Gracias también por velar siempre por mi futuro y animarme a volar.

A Teresa Bes por ayudarme siempre en lo que he necesitado. No me voy a olvidar de las largas discusiones sobre las Fures y tus visitas al laboratorio que hicieron felices momentos que no lo eran tanto. Gracias por aportarme siempre una visión diferente de las cosas.

Thanks Isabelle Michaud-Soret for tutoring me during my internship in your laboratory in Grenoble. Thank you for your continuing support and for deepen with us in the most structural aspects of this work. I am really honored for what I learnt from you and your expertise. Thanks also to the colleagues at the LCBM, who were willing to help in the lab during my internship.

A Ignacio Luque por supervisar mi trabajo durante la estancia en el IBVF de Sevilla y por enseñarme tantas cosas en tan corto periodo de tiempo. Agradecerte la confianza que depositaste en mí y tu sinceridad en todo momento. Gracias también a las personas en el IBVF que me brindaron su ayuda en el laboratorio y con quien compartimos buenos momentos durante mi corta estancia en Sevilla.

Gracias a mis compañeros del laboratorio durante estos años. En especial a Ángela, Sara, Jorge e Irene por vuestra compañía durante diferentes momentos de esta etapa y vuestra ayuda incondicional. He podido aprender aspectos muy valiosos de cada uno de vosotros y os lo agradezco de corazón.

A los demás compañeros y profesores del Departamento, por estar siempre dispuestos a ayudarme o a resolverme cualquier duda. A Marta Martínez Júlvez por su ayuda en los experimentos de cristalografía y la modelización de estructura de proteínas. Gracias por contagiarme tu entusiasmo por los cristales. A Andrés González por confiar en mí y transmitirme siempre positividad y buenos consejos.

También gracias a los técnicos Pili, Manoli y Fina por su ayuda y disposición en todo momento y a Marta Fajes por su gran generosidad y eficacia.

A mi grupo de amigas y amigos de Huesca, por tantas charlas y apoyo que me habéis dado en esta etapa. Gracias por inspirarme y estar siempre ahí. Os debo muchas.

A Javi. De verdad, gracias. Por tantas cosas... tu apoyo incondicional, tu amor y la paciencia que has tenido conmigo. Por esperarme en la puerta de la facultad. Por ayudarme a organizar los revoltijos de ideas. Tu optimismo y energía positiva que tanto me alientan están plasmados en este trabajo, me has enseñado mucho y confío en que finalizar esta etapa nos recompensará con vivir nuestro sueño como nunca.

Por último, gracias a mi familia. A mi hermana Belén, por escucharme y ofrecerme en todo momento los mejores consejos. Gracias por tu cariño y ayuda y por ser la mejor hermana mayor que he podido tener. Gracias a mis padres, por haberme dado todo, como la posibilidad de formarme haciendo lo que me gusta. Por vosotros estoy aquí, escribiendo estas líneas. A ti mamá, por inspirarme, darme amor y cuidarme en cada momento. A ti papá, por toda la confianza que depositaste en mí al empezar este camino y las fuerzas y seguridad que desde allá donde te encuentras me han llegado cada día como un rayo de sol para conseguir llegar hasta aquí, espero que te guste.

# Índice de contenidos

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

Resumen

Abstract

<b>1.</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Cianobacterias .....</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Características generales.....	1
1.1.2.	Implicaciones medioambientales y biotecnológicas.....	2
1.1.3.	Clasificación.....	3
1.1.4.	Comunicación intercelular y diferenciación.....	6
1.1.5.	Fotosíntesis oxigénica .....	7
<b>1.2.</b>	<b>Estrategias adaptativas frente a diferentes estreses abióticos en cianobacterias .....</b>	<b>8</b>
1.2.1.	Adaptación de las cianobacterias al estrés por alta luz. ....	9
1.2.2.	Respuesta a estrés oxidativo en cianobacterias .....	10
1.2.2.1.	Defensas enzimáticas frente a estrés oxidativo en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	11
1.2.2.2.	Principales sistemas de regulación de la respuesta al estrés oxidativo ....	13
1.2.3.	Respuesta a la deficiencia de nitrógeno en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	14
1.2.3.1.	Fijación de nitrógeno y heterocistos.....	14
1.2.3.2.	Control transcripcional de la diferenciación y desarrollo del heterocisto. 17	
1.2.4.	Adaptación a la limitación de carbono en cianobacterias .....	21
1.2.4.1.	Fijación de CO <sub>2</sub> y mecanismos CCM.....	21

1.2.4.2. Control transcripcional de la respuesta a limitación de carbono inorgánico y control del balance C/N.....	21
1.2.5. Control de la homeostasis del hierro .....	22
<b>1.3. La familia de metaloreguladores FUR .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4. Reguladores FUR en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....</b>	<b>25</b>
1.1.1. FurA .....	25
1.1.2. FurB .....	26
1.1.3. FurC .....	26
<b>1.2. Proteínas PerR (<i>Peroxide response Regulator</i>).....</b>	<b>27</b>
1.2.1. Características estructurales de proteínas PerR .....	28
1.2.2. Mecanismo de regulación de PerR: oxidación catalizada por metal (MCO)...	30
1.2.3. El regulón de PerR .....	31
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Organismos y condiciones de cultivo .....</b>	<b>39</b>
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.1.1.1. Medios y condiciones de cultivo.....	39
3.1.2. <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	39
3.1.2.1. Medios y condiciones de cultivo.....	40
3.1.2.2. Experimentos de inducción de estreses abióticos.....	41
<b>3.2. Métodos de aislamiento y análisis del DNA .....</b>	<b>42</b>
3.2.1. Aislamiento del DNA .....	42
3.2.1.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala (miniprep) y cuantificación del DNA.....	42
3.2.1.2. Extracción de DNA genómico de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	42
3.2.2. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .	43
3.2.3. Electroforesis de DNA .....	44

<b>3.3. Métodos de aislamiento y análisis del RNA .....</b>	<b>45</b>
3.3.1. Toma de muestra de cultivos de cianobacterias para la extracción de RNA ..	46
3.3.2. Extracción del RNA .....	46
3.3.3. Tratamiento con DNasa I y comprobación de la integridad del RNA.....	47
3.3.4. Cuantificación de RNA.....	47
3.3.5. Comprobación de la ausencia de DNA en las muestras de RNA aislado.....	48
3.3.6. Retrotranscripción.....	48
3.3.7. PCR a tiempo real .....	49
<b>3.4. Métodos de transformación de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>50</b>
3.4.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> termocompetentes.....	50
3.4.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico .....	51
<b>3.5. Sobreexpresión y purificación de FurC recombinante de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....</b>	<b>51</b>
3.5.1. Sobreexpresión de FurC y obtención de biomasa.....	51
3.5.1.1. Optimización de la expresión de FurC .....	51
3.5.1.2. Inducción de la sobreexpresión y obtención de biomasa.....	52
3.5.2. Purificación de FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	53
3.5.2.1. Fundamentos de las técnicas cromatográficas utilizadas.....	53
3.5.2.2. Montaje y equilibrado de las columnas.....	54
3.5.2.3. Obtención del extracto crudo a partir de biomasa.....	54
3.5.2.4. Purificación de FurC mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa seguida de cromatografía de heparina. ....	55
3.5.2.5. Purificación mediante cromatografía de heparina seguida de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa .....	56
3.5.2.6. Cromatografía de exclusión molecular. ....	57
<b>3.6. Técnicas analíticas de proteínas .....</b>	<b>58</b>
3.6.1. Diálisis de proteínas. ....	58
3.6.2. Concentración de proteínas .....	58

3.6.3.	Cuantificación de proteínas.....	59
3.6.4.	Electroforesis de proteínas en gel desnaturizante (SDS-PAGE) .....	59
<b>3.7.</b>	<b>Técnicas de caracterización biofísica .....</b>	<b>60</b>
3.7.1.	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) .....	60
3.7.2.	Cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a la medición de dispersión multiangular de luz láser e índice de refracción a tiempo real (SEC-MALLS-RI)...	62
<b>3.8.</b>	<b>Aproximación a la cristalización de FurC y del complejo FurC-DNA.....</b>	<b>64</b>
<b>3.9.</b>	<b>Ensayos de retardo en gel (EMSA) .....</b>	<b>66</b>
<b>3.10.</b>	<b>Técnicas inmunoquímicas .....</b>	<b>68</b>
3.10.1.	Producción de anticuerpos policlonales Anti-FurC .....	68
3.10.1.1.	Purificación de FurC desde gel SDS-PAGE para la producción del antisuero anti-FurC .....	68
3.10.1.2.	Obtención del antisuero frente a FurC .....	69
3.10.2.	Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y detección inmunológica de proteínas (Western-blot).....	70
<b>3.11.</b>	<b>Métodos analíticos para el estudio fenotípico de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....</b>	<b>71</b>
3.11.1.	Análisis del crecimiento y determinación de la tasa de duplicación.....	71
3.11.1.1.	Contaje celular .....	71
3.11.2.	Obtención de extractos proteicos solubles de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	72
3.11.3.	Cuantificación de proteína total en extractos proteicos.....	72
3.11.4.	Análisis del contenido en pigmentos fotosintéticos. ....	72
3.11.4.1.	Espectros de absorción de células enteras de <i>Anabaena</i> sp PCC7120....	72
3.11.4.2.	Determinación del contenido de clorofila <i>a</i> .....	73
3.11.4.3.	Determinación de ficobiliproteínas .....	73
3.11.4.4.	Determinación de carotenoides .....	73
3.11.5.	Determinación de la tasa de consumo y liberación de O <sub>2</sub> .....	74
3.11.6.	Análisis de la tolerancia a estrés oxidativo .....	74

3.11.7.	Análisis de actividades enzimáticas.....	75
3.11.7.1.	Determinación de la actividad catalasa .....	75
3.11.7.2.	Determinación de la actividad superóxido dismutasa.....	75
3.11.7.3.	Detección de la actividad superóxido dismutasa (MnSOD y FeSOD) mediante tinción en gel de poliacrilamida no desnaturizante. ....	77
<b>3.12.</b>	<b>Obtención y análisis del exoproteoma y exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC. ....</b>	<b>77</b>
3.12.1.	Consideraciones previas.....	78
3.12.2.	Puesta a punto de los cultivos para el análisis del exoproteoma y exometaboloma .....	78
3.12.3.	Aislamiento y procesamiento del exoproteoma y exometaboloma.....	79
<b>3.13.</b>	<b>Técnicas espectroscópicas.....</b>	<b>79</b>
3.13.1.	ICP-OES .....	79
3.13.2.	Espectrometría de fluorescencia a 77 Kelvin .....	80
3.13.3.	Espectrometría de masas .....	80
3.13.3.1.	Espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) .....	80
3.13.3.2.	Espectrometría de masas SWATH (SWATH-MS).....	81
<b>3.14.</b>	<b>Técnicas de microscopía.....</b>	<b>81</b>
3.14.1.	Microscopía óptica y de fluorescencia .....	81
3.14.1.1.	Tinción de proheterocistos y heterocistos con azul Alcian.....	82
3.14.2.	Microscopía electrónica .....	82
3.14.2.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	82
3.14.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	82
<b>3.15.</b>	<b>Análisis bioinformáticos.....</b>	<b>83</b>
3.15.1.	Modelado de la estructura tridimensional de FurC .....	83
3.15.2.	Identificación de la secuencia consenso de unión al DNA de FurC.....	83
3.15.3.	Predicción de sitios de unión de FurC en las regiones promotoras del genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	84

3.15.4.	Bases de datos para el análisis de secuencia y otras herramientas bioinformáticas utilizadas. ....	85
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1.</b>	<b>Capítulo I   Caracterización bioquímica y estructural de la proteína FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....</b>	<b>89</b>
4.1.1.	Sobreexpresión y purificación de FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	89
4.1.1.1.	Sobreexpresión de FurC recombinante .....	89
4.1.1.2.	Purificación de FurC recombinante de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	90
4.1.2.	Caracterización bioquímica de FurC.....	93
4.1.2.1.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de FurC/PerR de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 con sus ortólogos PerR.....	93
4.1.2.2.	FurC presenta un átomo de zinc fuertemente unido. ....	94
4.1.2.3.	Interacción de FurC:Zn con Mn <sup>2+</sup> y Zn <sup>2+</sup> : diferentes efectos en la actividad de FurC. ....	95
4.1.2.4.	Identificación mediante MALDI-TOF/MS de la incorporación de un átomo de oxígeno en FurC por oxidación catalizada por metal (MCO) .....	97
4.1.2.5.	Estudios de la oligomerización de FurC en condiciones nativas.....	98
4.1.2.6.	Análisis de la formación de puentes disulfuro en FurC .....	100
4.1.2.7.	Reversibilidad del estado oligomérico de FurC tras la oxidación y reducción. ....	102
4.1.2.8.	Efecto de la oxidación reversible o irreversible de FurC en su actividad de unión al DNA. ....	103
4.1.3.	Modelado de la estructura tridimensional del dímero y tetramero de FurC .....	104
4.1.4.	Cristalización de FurC y el complejo FurC-DNA.....	109
<b>4.2.</b>	<b>Capítulo II   Impacto de la sobreexpresión de <i>furC</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120: Implicación en la defensa frente a estrés oxidativo y relación con la fotosíntesis.....</b>	<b>117</b>
4.2.1.	Caracterización fenotípica de EB2770FurC, una cepa que sobreexpresa FurC en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	118
4.2.1.1.	Determinación de la sobreexpresión de FurC en la estirpe EB2770FurC. ....	118

4.2.1.2.	Crecimiento fotoautotrófico.....	118
4.2.1.3.	Morfología celular y ultraestructura.....	119
4.2.1.4.	Análisis de la composición en pigmentos fotosintéticos. Modulación de los genes relacionados con el ficobilisoma .....	122
4.2.1.5.	Determinación de la tasa neta de fotosíntesis y tasa respiratoria. Evaluación de la eficiencia fotosintética .....	125
4.2.1.6.	Análisis de los niveles del polipéptido D1 del PSII. ....	127
4.2.2.	Implicación de FurC en la respuesta frente a estrés oxidativo .....	128
4.2.2.1.	Tolerancia de la cepa EB2770FurC al estrés oxidativo.....	128
4.2.2.2.	Actividades catalasa y superóxido dismutasa en la estirpe EB2770FurC.	129
4.2.2.3.	Regulación transcripcional de los genes de respuesta a estrés oxidativo	130
<b>4.3.</b>	<b>Capítulo III   FurC/PerR, un regulador versátil involucrado en la regulación de la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno.....</b>	<b>136</b>
4.3.1.	Perfil transcriptómico de la estirpe EB2770FurC frente a <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	136
4.3.1.1.	Validación de los datos obtenidos por RNA-seq.....	138
4.3.1.2.	Análisis de la regulación directa mediada por FurC de las nuevas posibles dianas.	139
4.3.2.	Perfil transcripcional de la estirpe EB2770FurC y <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 en condiciones de deficiencia de nitrógeno.....	140
4.3.2.1.	Análisis de la expresión de dianas relacionadas con el metabolismo de nitrógeno en la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> , EB2770FurC.....	143
4.3.2.2.	FurC regula directamente la transcripción de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y la diferenciación de heterocistos.....	144
4.3.3.	Caracterización fenotípica de la estirpe EB2770FurC en respuesta a la ausencia de nitrato.....	145
4.3.3.1.	La estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> no es capaz de formar heterocistos	145
4.3.3.2.	Ensayos de viabilidad frente a la deficiencia de nitrógeno.....	147

<b>4.4. Capítulo IV   Perfilando el regulón de FurC: implicación de FurC en la regulación de procesos relacionados con el balance carbono/nitrógeno. ....</b>	<b>151</b>
4.4.1. Definición y análisis de una secuencia consenso de unión de FurC al DNA..	151
4.4.1.1. Obtención de la secuencia consenso de unión de FurC mediante MEME y FIMO.....	151
4.4.1.2. Análisis de la posición de la caja FurC con respecto al inicio de transcripción y las cajas TATA en las secuencias promotoras seleccionadas. ....	153
4.4.2. Identificación de nuevas cajas FurC mediante cribado masivo del genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	154
4.4.2.1. Validación de las nuevas secuencias de unión de FurC mediante ensayos de retardo en gel.....	155
4.4.2.2. Análisis de la expresión génica de las nuevas dianas de FurC en la estirpe EB2770FurC.....	160
4.4.3. Regulación de la expresión de <i>hetR</i> por FurC. ....	161
4.4.4. FurC une 2-OG aumentando la afinidad por sus promotores diana.....	163
<b>4.5. Capítulo V   Consecuencias de la sobreexpresión de <i>furC</i> en la composición del exoproteoma y exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....</b>	<b>168</b>
4.5.1. Optimización del método de obtención y aislamiento del exoproteoma y exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....	168
4.5.2. La sobreexpresión de <i>furC</i> altera el perfil del exoproteoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	170
4.5.2.1. Análisis de las posibles redes de interacción entre las proteínas cuya abundancia está alterada en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> .....	176
4.5.2.2. Estudio comparativo de los perfiles exometabólicos de las cepas de sobreexpresión de FurC y <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	179
<b>5. Discusión.....</b>	<b>184</b>
<b>5.1. FurC es un regulador PerR en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 que experimenta varios niveles de oxidación. ....</b>	<b>184</b>

5.2. Impacto de la sobreexpresión de <i>furC</i> en la fisiología de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120: implicación de FurC en la regulación de la división celular y la fotosíntesis. ....	188
5.3. FurC es un regulador global en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	190
5.4. FurC/PerR, un regulador transcripcional involucrado en el control del balance C/N..	192
5.5. La sobreexpresión de <i>furC</i> altera los perfiles del exoproteoma y exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	198
6. Conclusiones .....	205
7. Conclusions.....	209
8. Bibliografía .....	213

Anexo I: Material suplementario

Anexo II: Publicaciones



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético de las cianobacterias según Schirrmeister et al., 2015. ....	4
<b>Figura 2.</b> Imagen de microscopía óptica de campo claro de filamentos <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 tras 72 h en deficiencia de nitrato. ....	5
<b>Figura 3.</b> Diferenciación celular en cianobacterias filamentosas. ....	6
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los componentes de la cadena fotosintética de transporte lineal de electrones de cianobacterias ....	8
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la implicación de FtsH en el ciclo de reparación del PSII dañado.....	9
<b>Figura 6.</b> Características morfológicas y estructurales del heterocisto. ....	16
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del flujo de nutrientes entre los heterocistos y las células vegetativas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	16
<b>Figura 8.</b> Esquema general de la activación transcripcional de un grupo de genes seleccionados durante la diferenciación de heterocistos ejercida por HetR y NtcA. ....	18
<b>Figura 9.</b> Secuencia aminoacídica de FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120. ....	27
<b>Figura 10.</b> Estructura cristalográfica de PerR:Zn,Mn de <i>B. subtilis</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Solapamiento de las estructuras cristalográficas de PerR:Zn,Mn (PDB: 3F8N) (rosa) y PerR:Zn (PDB: 2RGV) (gris) de <i>B. subtilis</i> . ....	29
<b>Figura 12.</b> Modelo propuesto para el mecanismo de acción de regulación transcripcional de PerR de <i>B. subtilis</i> .....	31
<b>Figura 13.</b> Fundamentos del ensayo de ITC.....	61
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de un típico sistema SEC-MALLS-RI para la determinación del peso molecular de una proteína. ....	63
<b>Figura 15.</b> Oligonucleótidos diseñados para la cristalización de FurC unida al DNA.....	65
<b>Figura 16.</b> Prueba de sobreexpresión de FurC en <i>E. coli</i> BL21. Gel de SDS-PAGE al 17 % teñido con azul Coomassie.....	90
<b>Figura 17.</b> Electroforesis de las fracciones eluidas de la purificación de FurC mediante cromatografía de heparina seguida de DEAE-celulosa. ....	91

<b>Figura 18.</b> Esquema del protocolo de purificación de FurC mediante cromatografía en columna de unión a heparina seguida de cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa. ....	92
<b>Figura 19.</b> Análisis de la pureza y actividad de unión al DNA de FurC purificada mediante las columnas de heparina y DEAE-celulosa .....	93
<b>Figura 20.</b> Alineamiento de ClustalW de la secuencia primaria de la proteína FurC/PerR de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 (An) con las de PerR de <i>B. subtilis</i> (Bs), <i>C. jejuni</i> (Cj), <i>L. interrogans</i> (Li) y <i>S. pyogenes</i> (Sp). ....	94
<b>Figura 21.</b> Interacción de FurC con Zn <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup> en diferentes condiciones redox.....	95
<b>Figura 22.</b> Ensayo de EMSA de la interacción entre FurC (PerR) y la región promotora del gen <i>prxA</i> en presencia de Mn <sup>2+</sup> o Zn <sup>2+</sup> . ....	96
<b>Figura 23.</b> Perfiles de los espectros de masas MALDI-TOF-MS de FurC:Zn realizados para demostrar su oxidación mediada por MCO. ....	97
<b>Figura 24.</b> Análisis del perfil elución de cromatografía de exclusión molecular (SEC) de FurC:Zn incubada en diferentes condiciones. ....	98
<b>Figura 25.</b> Determinación del peso molecular mediante SEC-MALLS-RI de los estados oligoméricos de FurC:Zn aislados en SEC. ....	99
<b>Figura 26.</b> Efecto de la oxidación-reducción en la movilidad electroforética de las isoformas FurC:Zn. ....	101
<b>Figura 27.</b> Estudio de la reversibilidad de la oxidación del dímero de FurC:Zn mediante SEC-MALLS-RI. ....	102
<b>Figura 28.</b> Ensayos de retardo en gel mostrando la actividad de FurC:Zn en diferentes condiciones redox. ....	104
<b>Figura 29.</b> Modelos de un dímero y un tetrámero de FurC predichos por AlphaFold colab. Los modelos están coloreados según el parámetro de confianza pLDDT (Predicted Local Distance Difference Test). ....	105
<b>Figura 30.</b> Comparativa estructural del modelo de dímero de FurC de AlphaFold con los modelos deSWISS-MODEL generados a partir de diferentes estructuras cristalográficas del regulador PerR. ....	106
<b>Figura 31.</b> Comparación de los modelos de dímero de FurC de AlphaFold colab y SWISS-MODEL. ....	107

<b>Figura 32.</b> Distancias entre los C $\alpha$ de las cisteínas en posición 86 en el modelo de tetrámero de FurC generado con AlphaFold colab. ....	108
<b>Figura 33.</b> Cromatografía de exclusión molecular a escala analítica y análisis de SEC-MALLS-RI para la prueba de condiciones de purificación de FurC para ensayos de cristalización..	110
<b>Figura 34.</b> Purificación de FurC mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex™ S75 26/600. ....	111
<b>Figura 35.</b> Cristales obtenidos en la aproximación de cristalización de FurC (9 mg/mL) con las condiciones. ....	112
<b>Figura 36.</b> Cristales obtenidos con la fracción FurC-DNA y la condición “PEG 6000 15 %, MPD 5 %, MES 0,1 M pH 6,5”. ....	113
<b>Figura 37.</b> Niveles de transcripción y traducción de <i>furC</i> en la cepa EB2770FurC en comparación con la cepa silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	118
<b>Figura 38.</b> Determinación del crecimiento de la cepa de sobreexpresión de <i>furC</i> (EB2770FurC) en comparación con la cepa silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	119
<b>Figura 39.</b> Fotografías de microscopía óptica de campo claro y de fluorescencia de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> EB2770FurC.....	119
<b>Figura 40.</b> Microscopía de SEM y TEM de células de la cepa silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y la cepa de sobreexpresión de <i>furC</i> EB2770FurC recogidas en la fase exponencial de crecimiento. SEM y TEM ..	120
<b>Figura 41.</b> Estudio de la regulación por FurC de los genes de <i>ftsZ</i> y <i>ftsH</i> . ....	122
<b>Figura 42.</b> Espectro de UV-visible de células enteras de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 (línea continua) y EB2770FurC (línea discontinua). ....	122
<b>Figura 43.</b> Determinación del contenido en pigmentos y proteína total de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> (EB2770FurC). ....	123
<b>Figura 44.</b> Cambios relativos en los niveles de transcripción de genes que codifican diferentes subunidades y <i>linkers</i> del ficobilisoma en la cepa EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre. .	124
<b>Figura 45.</b> Ensayos de retardo en gel para el estudio de la unión de FurC a los promotores de los genes que codifican diferentes subunidades y <i>linkers</i> del ficobilisoma.....	125
<b>Figura 46.</b> Espectros de emisión de fluorescencia a 77K de las células de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC recogidas en la fase exponencial de crecimiento.....	126

<b>Figura 47.</b> Detección de la proteína D1 mediante Western Blot en extractos proteicos de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....	127
<b>Figura 48.</b> Ensayo de la tolerancia de las estirpes <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC al estrés oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	128
<b>Figura 49.</b> Determinación de las actividades SOD y catalasa de las cepas <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....	129
<b>Figura 50.</b> Gel de tinción específica de la actividad SOD de las cepas <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....	130
<b>Figura 51.</b> Análisis de la interacción de FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 con las regiones promotoras de <i>prxA</i> , <i>srxA</i> , <i>ahpC</i> , <i>CGT3</i> y <i>alr4404</i> mediante ensayos de retardo en gel. ...	131
<b>Figura 52.</b> Transcripción relativa en EB2770FurC con respecto a <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 determinada por Real Time RT-PCR de las peroxirredoxinas de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120, <i>srxA</i> , <i>sodA</i> y <i>catA</i> y su respuesta transcripcional al estrés oxidativo generado por la incubación con 250 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 1 h.....	132
<b>Figura 53.</b> Diagrama de las categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> .....	137
<b>Figura 54.</b> Validación de los datos obtenidos por RNA-seq mediante Real Time RT-PCR. Transcripción relativa de los genes <i>asl3849</i> , <i>fecB</i> , <i>iacT</i> , <i>all1648</i> , <i>alr7354</i> , <i>nucA</i> y <i>sigG</i> . determinada por Real Time RT-PCR.....	139
<b>Figura 55.</b> Ensayos de retardo en gel que confirman la unión de FurC a los promotores de los genes <i>psbAIV</i> , los operones <i>alr4028-33</i> y <i>all3914-13</i> , <i>all7016</i> y <i>alr9013</i> .....	140
<b>Figura 56.</b> Anotación funcional de los genes expresados diferencialmente en EB2770FurC respecto a <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 en condiciones estándar de cultivo y tras 48 h de deficiencia de nitrógeno. ....	141
<b>Figura 57.</b> Transcripción relativa de los genes <i>hetZ</i> , <i>henR</i> , <i>hepC</i> , <i>alr3646</i> , <i>alr4973</i> , <i>hglE2</i> , <i>xisH</i> , <i>nifH</i> , <i>nifH2</i> , <i>asr1734</i> y <i>nrtA</i> determinada por Real Time RT-PCR.....	143
<b>Figura 58.</b> Ensayos de retardo en gel FurC con promotores de los genes relacionados con la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno. ....	144
<b>Figura 59.</b> Microscopía óptica de campo claro de células de la estirpe silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> , EB2770FurC en suficiencia o deficiencia de nitrato. ....	146

<b>Figura 60.</b> Respuesta de clorosis en la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> , EB2770FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno. ....	147
<b>Figura 61.</b> Ensayos de viabilidad <i>Anabaena</i> sp PCC7120 y EB2770FurC en presencia o ausencia de nitrato. ....	147
<b>Figura 62.</b> Logo de la caja FurC de 19 pb construida utilizando MEME.....	153
<b>Figura 63.</b> Representación esquemática de la localización de la caja FurC en las regiones promotoras de los genes seleccionados .....	154
<b>Figura 64.</b> Secuencias de unión a FurC utilizadas por MEME para la generación de la versión restrictiva de la caja FurC y logo obtenido para la búsqueda.....	155
<b>Figura 65.</b> Ensayos de retardo en gel para la validación de la unión de FurC a los promotores de los genes seleccionados .....	157
<b>Figura 66.</b> Cambio relativo en la expresión de las nuevas dianas directas de FurC en la cepa EB2770FurC respecto a la cepa silvestre <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	160
<b>Figura 67.</b> Representación esquemática de la posición relativa de la caja FurC respecto a la caja TATA en los promotores de las nuevas dianas de FurC.....	161
<b>Figura 68.</b> Estudio de la regulación de <i>hetR</i> por FurC. A) Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones distal (P1), media (P2) y proximal (P3) del promotor de <i>hetR</i> . ....	162
<b>Figura 69.</b> Análisis mediante ITC de la interacción de FurC con 2-OG y glutamato bajo diferentes condiciones experimentales.....	164
<b>Figura 70.</b> Evaluación de la actividad de unión de FurC a los promotores de <i>hetZ</i> , <i>hepC</i> y <i>hgdC</i> en presencia o ausencia de 1 mM de 2-OG. ....	165
<b>Figura 71.</b> Esquema resumen del procedimiento utilizado para la obtención de las fracciones de exoproteoma y exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC. ....	170
<b>Figura 72.</b> Volcano plot del exoproteoma diferencial de la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> EB2770FurC y <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	172
<b>Figura 6.</b> Características morfológicas y estructurales del heterocisto .....	173
<b>Figura 73.</b> Categorías funcionales de las proteínas cuya abundancia varía en el exoproteoma de la estirpe EB2770FurC con respecto al de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.. ....	173
<b>Figura 74.</b> Red construida con STRING ( <a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a> ) .....	177

<b>Figura 75.</b> Comparativa de los perfiles metabolómicos de las fracciones del exometaboloma de <i>Anabaena</i> sp. PCC71200 y la cepa de sobreexpresión de <i>furC</i> .....	180
<b>Figura 76.</b> Representación esquemática de los dos niveles de oxidación integrados por FurC...	187
<b>Figura 77.</b> Esquema general de la regulación transcripcional ejercida por FurC sobre las dianas que participan en las diferentes fases de la diferenciación del heterocisto en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	193
<b>Figura 78.</b> Diagrama general de la regulación ejercida por FurC de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del nitrógeno y carbono en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120....	196

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Diferentes subclases de reguladores de la familia FUR y sus respectivas señales....	24
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>E. coli</i> .....	39
<b>Tabla 4.</b> Medio basal BG11 1X (3 litros).....	39
<b>Tabla 5.</b> Suplemento BG11 1000X (100 mL).....	39
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para reacción de PCR con Taq polimerasa.....	43
<b>Tabla 7.</b> Composición de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	60
<b>Tabla 8.</b> Composición de los geles no desnaturalizantes de poliacrilamida.....	67
<b>Tabla 9.</b> Valores de las constantes de afinidad y número de sitios de unión para la interacción FurC:Zn con Mn <sup>2+</sup> o Zn <sup>2+</sup> .....	96
<b>Tabla 10.</b> Masas teóricas y experimentales de la subunidad y oligómeros de FurC.....	103
<b>Tabla 11.</b> Actividades fotosintética neta y respiratoria de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y EB2770FurC.....	125
<b>Tabla 12.</b> Secuencias de unión de FurC encontradas en las regiones promotoras de genes regulados directamente por FurC.....	152
<b>Tabla 13.</b> Nuevas dianas directas de FurC encontradas por la búsqueda de la caja de FurC en el genoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 y resultado de su validación por EMSA.....	156
<b>Tabla 14.</b> Lista de proteínas cuya abundancia cambia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> con respecto al de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 descritas previamente como dianas de FurC y/o mostraron diferencias en la expresión entre ambas cepas en condiciones estándar y/o deficiencia de nitrógeno del Capítulo 4.....	174
<b>Tabla 15.</b> Lista de proteínas relacionadas con la pared celular con diferencias en la abundancia relativa en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> (EB2770FurC) con respecto al exoproteoma de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	179



## Abreviaturas

<b>ABC</b>	ATP-binding cassette
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BIFI</b>	Instituto de Biocomputación y Física de sistemas complejos
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin (Albúmina sérica bovina)
<b>CBB</b>	Ciclo de Calvin Benson Bassham
<b>CCM</b>	CO <sub>2</sub> Concentrating Mechanism (Mecanismos de concentración del CO <sub>2</sub> )
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CEA</b>	Atomic Energy Commission (Comisión de Energía Atómica)
<b>CEBAS</b>	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
<b>Cit</b>	Citocromo
<b>CPG</b>	Gránulos polares de cianoficina
<b>CSIC</b>	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>Ct</b>	Ciclo umbral de amplificación
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>Da</b>	Dalton
<b>DDA</b>	Data-dependent acquisition (Adquisición dependiente de datos)
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DIA</b>	Data-independent acquisition (Adquisición independiente de datos)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleótido
<b>DNasa I</b>	Desoxirribonucleasa I
<b>dNTPs</b>	Mezcla de cuatro desoxirribonucleótidos
<b>dRI</b>	Differential Refractive Index (Índice de diferencial de refracción)
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena
<b>DTT</b>	1,4-Ditiotreitol (DTT)
<b>EB2770FurC</b>	Estirpe de sobreexpresión de <i>furC</i> en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory

<b>EMSA</b>	Electrophoretic Mobility Shift Assay (Ensayo de retardo en gel de la movilidad electroforética)
<b>Fd</b>	Ferredoxina
<b>FNR</b>	Ferredoxina-NADP+ reductasa
<b>FUR</b>	Ferric Uptake Regulator
<b>FurC:Zn</b>	Forma apo de FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<b>FurC ox</b>	Forma oxidada por MCO de FurC (+ 16 Da)
<b>GlcNAc</b>	N-acetil-glucosamina
<b>GOGAT</b>	Glutamina oxoglutarato aminotransferasa/glutamato sintasa
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>h</b>	Horas
<b>HEP</b>	Heterocyst-envelope polysaccharide layer (Capa de polisacáridos del heterocisto)
<b>HGL</b>	Heterocyst-specific glycolipid layer (Capa de glicolípidos del heterocisto)
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
<b>HTX-lab</b>	High Throughput Crystallization Facility
<b>IACS</b>	Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
<b>ICP-OES</b>	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma de acoplamiento inductivo)
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>ITC</b>	Isothermal titration calorimetry (Calorimetría de titulación isotérmica)
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Litros
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria Bertani
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LCBM</b>	Laboratory of Chemistry and Biology of Metals
<b>LC-MS</b>	Liquid chromatography-mass spectrometry (Cromatografía líquida con espectrometría de masas)
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
<b>MCO</b>	Metal Catalyzed Oxidation (Oxidación catalizada por metal)
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Militros
<b>mM</b>	Concentración milimolar
<b>MPD</b>	2-Metil-2,4-pentanediol
<b>MQ</b>	Milli-Q
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MS</b>	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
<b>Mur</b>	Manganese Uptake Regulator
<b>MurNAc</b>	Ácido N-Acilmurámico
<b>NADP</b>	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato (oxidada)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato (reducida)
<b>NBT</b>	Nitro azul de tetrazolio
<b>NPQ</b>	Non Photochemical Quenching (Quenching No fotoquímico)
<b>Nur</b>	Nickel Uptake Regulator
<b>O/N</b>	Overnight (Durante toda la noche)
<b>OCP</b>	Orange Carotenoid Protein (Proteína carotenoide naranja)
<b>p/v</b>	Relación peso/volumen
<b>PAE</b>	Predicted aligned error
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PC</b>	Plastocianina
<b>PCC</b>	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PerR</b>	Peroxide response Regulator
<b>PerR:Zn</b>	Forma apo de PerR de <i>B. subtilis</i>
<b>PerR:Zn,Mn</b>	Forma activa de PerR de <i>B. subtilis</i> con Mn
<b>PerR:Zn,Fe</b>	Forma activa de PerR de <i>B. subtilis</i> con Fe
<b>pl</b>	Punto isoeléctrico
<b>pLDDT</b>	Predicted local distance difference test
<b>PM/MW</b>	Peso molecular / Molecular weight
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
<b>Prx-s</b>	Peroxirredoxinas

<b>PSA</b>	Persulfato amónico
<b>PSI</b>	Fotosistema I
<b>PSII</b>	Fotosistema II
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilo
<b>P<sub>x</sub></b>	Región promotora del gen x
<b>R.B.</b>	Running buffer (Tampón de electroforesis)
<b>Real Time RT-PCR</b>	Retrotranscripción seguida de PCR a tiempo Real
<b>RI</b>	Índice de refracción
<b>RMSD</b>	Root Mean Square Deviation
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RuBisCO</b>	Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa
<b>s</b>	Segundos
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato Sódico)
<b>SDS-PAGE</b>	SDS Polyacrilamide gel electrophoresis (Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS)
<b>SEC</b>	Size-Exclusion Chromatography (Cromatografía de exclusión molecular)
<b>SEC-MALLS</b>	Multi-angle light scattering with size-exclusion chromatography (Cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión multiangular de luz láser)
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy (Microscopía electrónica de barrido)
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>sRNA</b>	RNA pequeño
<b>SWATH</b>	Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment ion spectra
<b>TBDT</b>	TonB dependent transporter (Transportador dependiente de TonB)
<b>TCEP</b>	Tris (2-carboxietil) fosfina
<b>TEM</b>	Transmission electron microscopy (Microscopía electrónica de transmisión)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de hibridación
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UV</b>	Ultravioleta

<b>UV-Vis</b>	Luz ultravioleta-Visible
<b>V</b>	Voltios
<b>vol.</b>	Volúmenes
<b>WT</b>	Wild Type (estirpe silvestre)
<b>x g</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>Zur</b>	Zinc Uptake Regulator
<b>ε</b>	Coeficiente de extinción
<b>τ</b>	Tasa de duplicación
<b>μg</b>	Microgramos
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μm</b>	Micrómetros
<b>2-OG</b>	2-oxoglutarato
<b>2-oxoPerR:Zn</b>	Forma oxidada por MCO de PerR de <i>B. subtilis</i>
<b>2-PG</b>	2-fosfoglicolato
<b>Ga</b>	Gigaaños
<b>GOE</b>	Great Oxidation Event (Gran Oxidación)



# Resumen



## RESUMEN

Las proteínas FUR (*Ferric Uptake Regulator*) constituyen una familia de reguladores transcripcionales con una gran diversidad de funciones. Hasta la realización de este trabajo, el regulador FurC era el miembro menos estudiado de la familia FUR en la cianobacteria fijadora de nitrógeno *Anabaena* sp. PCC7120. FurC fue previamente descrita como el ortólogo de PerR (*Peroxide response Regulator*). Estudios independientes revelaron que este regulador era esencial en *Anabaena* sp. PCC7120 y no en la cianobacteria no diazótrofa *Synechocystis* sp. PCC6803, lo que sugería que FurC podía desempeñar un papel fundamental en cianobacterias fijadoras de nitrógeno. En esta tesis doctoral se ha realizado una caracterización exhaustiva de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120, desde sus características bioquímicas hasta su función biológica en la cianobacteria y se han investigado tanto los aspectos relacionados con su papel canónico como regulador PerR, como su implicación en procesos más allá de la defensa frente al estrés oxidativo.

En lo relativo a sus características bioquímicas, en este trabajo se ha demostrado que FurC presenta un átomo de Zn fuertemente unido por monómero de proteína, además de un sitio de unión a metal regulador, en el que FurC es capaz de incorporar  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ . Por otro lado, se observó que en condiciones reductoras la forma oligomérica predominante de FurC es un dímero. Los ensayos de oligomerización y estudios de actividad pusieron de manifiesto que FurC puede presentar dos niveles de oxidación. Además de la inactivación irreversible mediante oxidación catalizada por metal, FurC se puede oxidar reversiblemente en presencia de  $H_2O_2$  o diamida mediante la formación de puentes disulfuro entre dímeros para formar oligómeros de mayor peso molecular.

En cuanto a su función biológica, los resultados de este estudio muestran que FurC es un regulador global de la transcripción en cianobacterias, interconectando la respuesta al estrés oxidativo característica de los reguladores PerR con otros múltiples procesos celulares, incluyendo la fotosíntesis, la división celular, la homeostasis del hierro, la diferenciación de heterocistos y el metabolismo central del carbono. En concreto, FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 ha mostrado un papel relevante en la regulación directa de genes que actúan en las diferentes fases de la diferenciación del heterocisto y la fijación del nitrógeno. Por otro lado, se han descrito nuevas dianas de FurC involucradas en el metabolismo del carbono, así como su capacidad para interactuar con 2-OG, lo que confirma el importante papel de este regulador en el control de procesos dependientes de la ratio C/N.

Finalmente, se han realizado análisis comparativos del exoproteoma y exometaboloma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) y de *Anabaena* sp. PCC7120. Se encontraron cambios en la abundancia de 213 proteínas en el exoproteoma de EB2770FurC pertenecientes a diversas categorías funcionales. Entre ellas, se encontraron en menor abundancia un grupo de proteínas relacionadas con la pared celular y su integridad, incluyendo, entre otras, diversas porinas y amidasas de mureína. Los análisis comparativos del exometaboloma de ambas cepas revelaron que la estirpe de sobreexpresión de *furC* presenta en el medio extracelular mayor cantidad de los precursores del peptidoglicano anhydroMurNAc y GlcNAc-anhydroMurNA, metabolitos de gran interés para la industria farmacéutica.

# Abstract



**ABSTRACT**

FUR (Ferric Uptake Regulator) proteins constitute a family of transcriptional regulators displaying a wide range of cellular functions. FurC from the filamentous, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 was the most unknown regulator of the family in this cyanobacterium. FurC was previously described in the literature as the PerR (Peroxide response Regulator) ortholog in *Anabaena* sp. PCC7120. Previous studies revealed that this regulator was essential in *Anabaena* sp. PCC7120, while in the non-diazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 was not, suggesting that FurC could play a key role in nitrogen-fixing cyanobacteria. In this PhD Thesis, an extensive characterization of FurC from *Anabaena* sp. PCC7120 was performed, including the study of its biochemical features and its biological function in this cyanobacterium. Through these approaches, this thesis has explored aspects related to the FurC canonical function as a PerR regulator, as well as its involvement in processes beyond the defense against oxidative stress in cyanobacteria.

Regarding the biochemical features of the regulator, this work has demonstrated that FurC presents a tightly bound Zn atom per monomer in addition to a regulatory metal-binding site into which FurC can incorporate Zn<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup>. On the other hand, it was observed that under reducing conditions the predominant oligomeric form of FurC is a dimer. Moreover, oligomerization analyses and DNA-binding activity studies showed that FurC undergoes two oxidation levels. In addition to the irreversible inactivation by metal catalyzed oxidation (MCO), FurC can be reversibly oxidized in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide by forming disulfide bridges between dimers to form higher molecular weight oligomers.

Concerning its biological function, the results from this study show that FurC is a global regulator in cyanobacteria, interconnecting the canonical response to oxidative stress displayed by PerR regulators with other multiple cellular processes, including photosynthesis, cell division, iron homeostasis, heterocyst differentiation and central carbon metabolism. Specifically, FurC from *Anabaena* sp. PCC7120 has displayed a relevant role in the direct regulation of genes that participated in the different phases of heterocyst differentiation and nitrogen fixation. On the other hand, novel FurC targets involved in carbon metabolism have been described, as well as the ability of FurC to interact with 2-OG, confirming the significant role of this regulator in the control of processes dependent of the C/N ratio.

Finally, the exoproteome and exometabolome profiles of the *furC*-overexpressing strain EB2770FurC compared to those of *Anabaena* sp. PCC7120 have been analyzed. This study showed alterations in the abundance of 213 proteins in the EB2770FurC exoproteome, which belonged to several functional categories. Among them, a group of proteins related to the cell wall and its integrity were found in lower abundance. Furthermore, comparative analyses of the exometabolome of both strains revealed that the *furC*-overexpressing strain presented a higher quantity of anhydroMurNAc and GlcNAc-anhydroMurNA peptidoglycan precursors in the extracellular milieu, metabolites of great interest to the pharmaceutical industry.

# Introducción



## 1. Introducción

### 1.1. Cianobacterias

#### 1.1.1. Características generales

Las cianobacterias constituyen un *phylum* muy diverso, aunque bien definido, dentro de las eubacterias, siendo uno de los subgrupos más grandes de Gram-negativos (Woese, 1987). Su pared celular presenta los rasgos típicos de las bacterias Gram-negativas, como una membrana externa que envuelve la capa de peptidoglicano y define un espacio periplásmico entre la membrana externa y la membrana plasmática (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Sin embargo, su pared celular también presenta características propias de las bacterias Gram-positivas, como por ejemplo el mayor grosor de la capa de peptidoglicano (Hoiczky & Hansel, 2000).

La característica principal de cianobacterias radica en que poseen un aparato fotosintético análogo en función y estructura al de los cloroplastos de las algas y plantas superiores, lo que les convierte en los únicos organismos procariontes capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (Stanier & Cohen-Bazire, 1977, Deruyter & Fromme, 2008). Sin embargo, a diferencia de las algas y plantas superiores, la mayoría de las cianobacterias carecen de clorofila *b* (Stanier & Cohen-Bazire, 1977) y cuentan con ficobilisomas, unas estructuras supramoleculares presentes en las membranas tilacoidales constituidas por pigmentos antena, denominados genéricamente ficobiliproteínas (Grossman et al., 1993).

Los ancestros de las cianobacterias jugaron un papel esencial en el desarrollo de la vida en la Tierra tal y como la conocemos ahora, ya que la liberación de oxígeno asociada a su actividad fotosintética produjo una transformación de la atmósfera primitiva anóxica en una atmósfera rica en oxígeno durante un periodo denominado como la Gran Oxidación (GOE) hace aproximadamente 2.32 billones de años (Bekker et al., 2004). Este evento generó una fuerte presión selectiva sobre el resto de organismos anaerobios estrictos, que suscitó el desarrollo de diversos mecanismos de resistencia al oxígeno y promovió la aparición de cadenas de transporte electrónico con el oxígeno como aceptor final de los electrones, originando así el metabolismo heterotrófico aeróbico (Knoll, 2008, Buick, 1992, Hayes, 1983, Falkowski et al., 2005). Dado su impacto tan fuerte en la vida temprana del planeta, se podría esperar que el éxito evolutivo de este *phylum* también haya desencadenado más cambios en la biosfera durante la historia temprana de la Tierra.

Sin embargo, se sabe muy poco sobre la evolución de los ancestros de este filo y existen en la actualidad debates en curso sobre fósiles de cianobacterias, biomarcadores y análisis del reloj molecular que resaltan las dificultades en este campo de investigación. Recientemente se ha postulado que 500 millones de años antes del evento de la gran oxidación (2.3 Ga) ya se encontraron indicios de fotosíntesis oxigénica encontrando niveles de oxígeno libre (Planavsky et al., 2014), datos que coinciden con recientes estudios filogenéticos del fotosistema II (PSII) (Cardona, 2018, Cardona et al., 2019, Sánchez-Baracaldo & Cardona, 2020). Por otra parte, las cianobacterias también contribuyeron al desarrollo de los eucariotas fotosintéticos, dada la hipótesis ampliamente aceptada de que los cloroplastos de algas y plantas superiores derivan de cianobacterias ancestrales que establecieron una relación de endosimbiosis con otra célula (Margulis, 1975, Ochoa De Alda et al., 2014)

Hasta la actualidad, las cianobacterias han colonizado una gran diversidad de hábitats, llegando a encontrarse en la mayoría de los ecosistemas estudiados, incluyendo hábitats extremos como las regiones árticas, aguas termales y desiertos (Moreira et al., 2013). Además, algunas especies establecen simbiosis con hongos, plantas, esponjas y protistas (Adams, 2000, Meeks & Elhai, 2002). Esta gran adaptabilidad a diferentes condiciones de temperatura, disponibilidad de nutrientes o la intensidad o calidad de luz se ha relacionado con la existencia de sistemas de regulación específicos de estos organismos, complementarios a otros más generales encontrados en otras bacterias (Tandeau De Marsac & Houmard, 1993)

### **1.1.2. Implicaciones medioambientales y biotecnológicas**

Las cianobacterias tienen una gran relevancia ecológica y medioambiental, dado que contribuyen en gran medida a la producción primaria en los océanos, jugando un papel esencial en el mantenimiento de los ciclos del carbono, nitrógeno y oxígeno, mediante la fijación de estos elementos (Montoya et al., 2004, Bergman et al., 1997). La fijación de nitrógeno atmosférico realizada por cianobacterias diazotróficas en ambientes acuáticos deficientes de nitrógeno resulta muy beneficiosa, de manera que el amonio producido por la fijación de nitrógeno representa una fuente de nitrógeno que soporta al resto de la cadena trófica. Sin embargo, en algunas ocasiones, el crecimiento de cianobacterias se vuelve excesivo y pueden llegar a dominar sobre la microbiota autóctona, generando los denominados *blooms* de cianobacterias. Estos *blooms* tienen un impacto negativo en la calidad de las aguas ya que reducen la captación de oxígeno, apantallan la radiación solar y pueden generar acumulación de cianotoxinas, que afectan tanto al equilibrio del ecosistema acuático como a la salud humana. De hecho, las

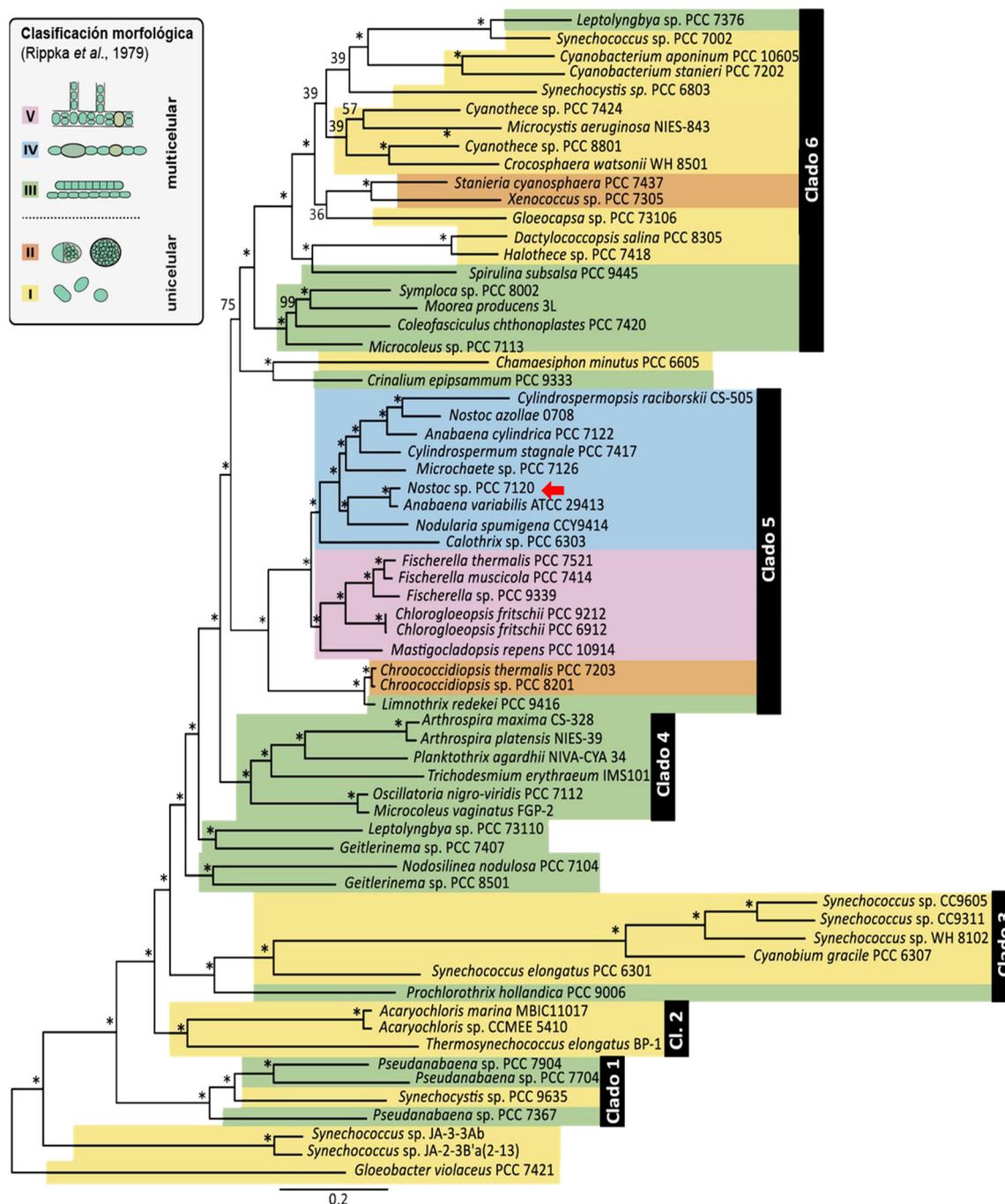
cianotoxinas pueden provocar la muerte de los peces, moluscos, crustáceos e insectos en contacto con el agua contaminada (Ferrão-Filho & Kozlowsky-Suzuki, 2011) y además pueden provocar graves daños hepáticos, neurológicos y respiratorios en el ser humano si se produce contacto o ingestión del agua contaminada (Pantelić et al., 2013, Manganelli et al., 2012, Aráoz et al., 2010). Por otro lado, las cianobacterias tienen una variedad de aplicaciones biotecnológicas muy positivas, como su aplicación en biorremediación (Sarmah & Rout, 2020) y como fertilizante de aguas y suelos (Maqubela et al., 2012, Chittora et al., 2020) o su uso para la síntesis de metabolitos secundarios con alto valor en la industria farmacéutica, producción de biocombustibles, incluyendo etanol e hidrogeno, o producción de bioplásticos (Cassier-Chauvat & Chauvat, 2018, Lin & Pakrasi, 2019, Pereira et al., 2019, Demay et al., 2019)

### 1.1.3. Clasificación

Las cianobacterias constituyen uno de los subgrupos más grandes de procariotas Gram-negativos y por ello se clasificaron dentro del grupo de las eubacterias. Debido a su amplia diversidad morfológica y diferente grado de complejidad las clasificaciones taxonómicas tradicionales dividieron a las cianobacterias en cinco secciones taxonómicas en función de su morfología y del modo en que transcurre su división celular (Rippka, 1979):

- Sección I (Chroococcales), cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria como los generos *Synechococcus* o *Synechocystis* , o división por gemación como (*Chamaesiphon*).
- Sección II (Pleurocapsales), cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión múltiple y/o binaria dando lugar a células hijas de menor tamaño llamadas baeocitos, como las de los géneros *Pleurocapsa* o *Xenococcus*.
- Sección III (Oscillatoriales) se agrupan las estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, como los géneros *Pseudoanabaena*, *Oscillatoria* y *Spirulina*.
- Sección IV (*Nostocales*), cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos y que se dividen en un solo plano formando filamentos no ramificado, como los géneros *Anabaena*, *Nostoc* o *Calothrix*.
  - Sección V (Stigonematales) incluye estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en más de un plano, dando lugar a una organización multicelular más compleja con filamentos con ramificaciones auténticas, como las de los generos *Fischerella* o *Scytonema*.

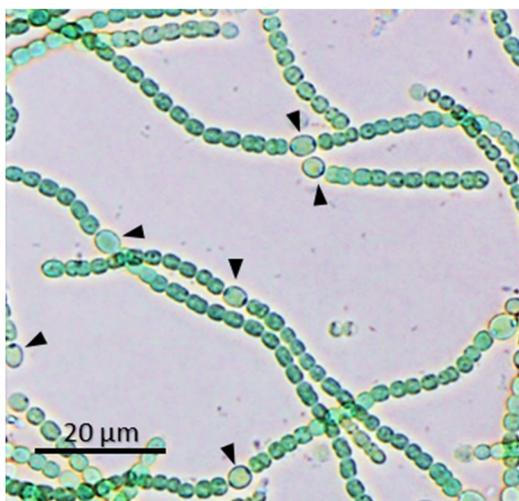
A pesar de la vigencia y utilidad de la clasificación tradicional, los estudios de filogenia molecular han demostrado que en algunos casos la clasificación morfológica no coincide con los resultados de los análisis filogenéticos (Giovannoni et al., 1988, Sanchez-Baracaldo et al., 2005, Tomitani et al., 2006, Turner et al., 1999) (Figura 1).



**Figura 1. Árbol filogenético de las cianobacterias según Schirrmeyer et al., 2015.** A la derecha del árbol se muestra la clasificación filogenómica mostrando los 6 clados identificados en dicho trabajo. Cada rama horizontal del árbol aparece coloreada según la sección a la que pertenece en la clasificación morfológica de (Rippka, 1979), de acuerdo con el código de colores que se indica arriba a la izquierda del árbol. La flecha roja indica el organismo de referencia utilizado en este trabajo, *Nostoc* sp. PCC7120 (= *Anabaena* sp. PCC 7120). Imagen adaptada de (Schirrmeyer et al., 2015)

Solo aquellos grupos que pueden llevar a cabo la diferenciación celular (Secciones IV y V) son filogenéticamente coherentes (Sanchez-Baracaldo et al., 2005, Shih et al., 2013, Schirrmeister et al., 2015). En la clasificación filogenómica realizada por Schirrmeister *et al.*, 2015, las cianobacterias se clasificaron en 6 clados principales (Figura 1). Esta clasificación y anteriores (Shih et al., 2013), pusieron de manifiesto, que la capacidad de formar filamentos y la división celular en varios planos aparecieron en múltiples momentos y de forma independiente a lo largo de la evolución. Además, estos análisis filogenéticos sugieren un origen monofilético del grupo de las cianobacterias capaces de la diferenciación celular (heterocistos), pertenecientes a las Secciones IV y V de Rippka.

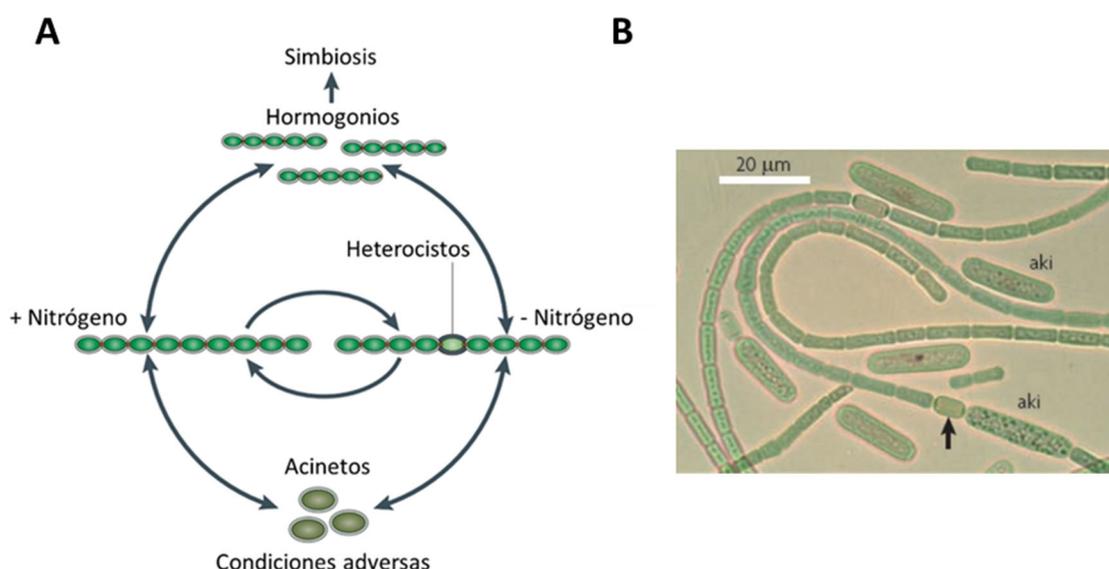
La cianobacteria utilizada en esta Tesis Doctoral ha sido *Anabaena* sp. PCC7120 (*Nostoc* sp. PCC7120), una cianobacteria filamentosamente comúnmente utilizada como organismo modelo para el estudio de la diferenciación celular y la fijación del nitrógeno ya que, en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado, es capaz de diferenciar heterocistos (Herrero & Flores, 2019), unas células especializadas en la fijación de  $N_2$  atmosférico (Figura 2). El genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 consta de 7,2 Mb distribuidas entre un cromosoma circular de 6,4 Mb, y 6 plásmidos de entre 5.5 kb y 408 kb, denominados de mayor a menor tamaño como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  (Kaneko et al., 2001).



**Figura 2. Imagen de microscopía óptica de campo claro de filamentos *Anabaena* sp. PCC7120 tras 72 h en deficiencia de nitrato. Se observan células vegetativas y heterocistos. Los heterocistos se señalan con una flecha negra.**

### 1.1.4. Comunicación intercelular y diferenciación

Algunas cianobacterias filamentosas, como *Anabaena* sp. PCC7120, poseen un sistema de transporte y comunicación entre las células de los propios filamentos. Una de las vías de comunicación es a través del espacio periplásmico. Esto es posible porque durante la división celular no se da la hidrólisis de la capa de peptidoglicano ni la invaginación de la membrana externa como ocurre en cianobacterias unicelulares (Vollmer et al., 2008, Typas et al., 2011). Por lo tanto, la membrana externa tiene continuidad a lo largo del filamento, lo que implica la presencia de un periplasma funcionalmente continuo (Flores et al., 2006, Schneider et al., 2007, Mariscal et al., 2007, Ledala et al., 2007). Además de esta vía de comunicación, también se ha observado que las células de cada filamento quedan unidas por complejos proteicos localizados en una estructura llamada septo. Estos complejos proteicos atraviesan la capa peptidoglicano del septo formando las llamadas “uniones septales” a través de unas perforaciones denominadas nanoporos implicadas también en la transferencia intercelular de compuestos (Lehner et al., 2013, Nürnberg et al., 2014). Otro de los aspectos más ventajosos de *Anabaena* sp. PCC7120 y otras cianobacterias filamentosas es su capacidad de diferenciación celular, siendo uno de los pocos casos existentes en procariontes (Whitton & Potts, 2002) (Figura 3).



**Figura 3. Diferenciación celular en cianobacterias filamentosas.** A) Representación esquemática de la diferenciación celular. En deficiencia de nitrógeno se produce la diferenciación a heterocistos, células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico. Los hormogonios están involucrados en el establecimiento de relaciones simbióticas. Los acinetos se forman bajo condiciones ambientales adversas. B) Fotografía de microscopía óptica de acinetos y heterocistos en *Anabaena* sp. PCC 7120. Los heterocistos se indican con flechas negras. Se observan acinetos (aki) dentro de los filamentos y también libres. La escala se indica sobre la barra blanca. Esquema y fotografía tomados de Flores & Herrero, 2010.

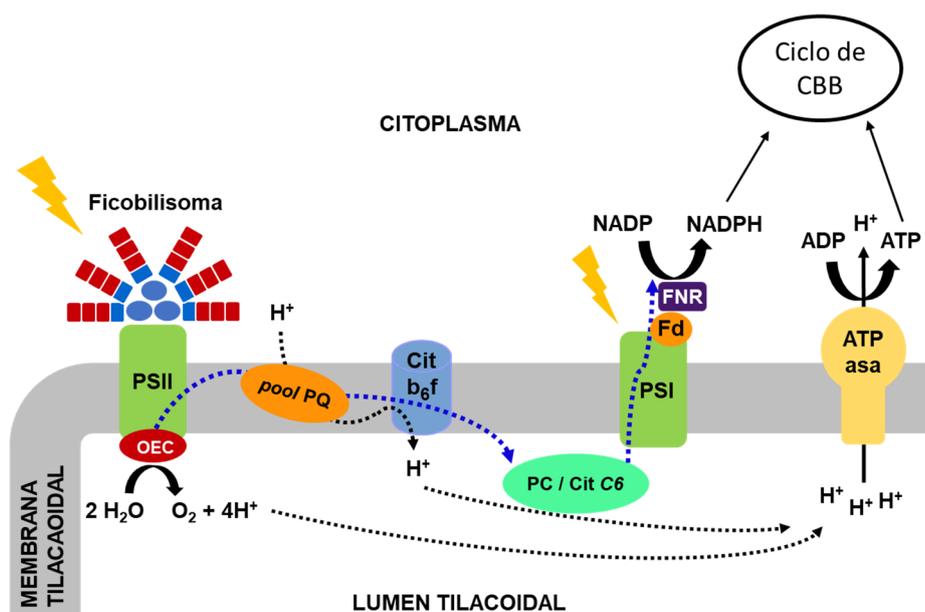
Las células de *Anabaena* sp. PCC7120 son capaces de desarrollar células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico, denominadas heterocistos (Figura 3.A, B) (apartado 1.2.3.1), células de resistencia a condiciones adversas denominadas acinetos (Figura 3.A, B) u hormogonios, pequeños filamentos móviles independientes del filamento vegetativo que están implicados en la dispersión del organismo y en el establecimiento de relaciones simbióticas (Figura 3.A) (Flores & Herrero, 2010). Mientras que las células que se diferencian a acinetos y hormogonios pueden revertir a células vegetativas y seguir dividiéndose en condiciones favorables, la diferenciación de heterocistos es un proceso irreversible (Kaplan-Levy et al., 2010, Meeks & Elhai, 2002).

### 1.1.5. Fotosíntesis oxigénica

En cianobacterias, la fotosíntesis oxigénica funciona en esencia del mismo modo que en algas y plantas superiores. Sin embargo, las cianobacterias cuentan con algunas características particulares, como la presencia simultánea de la actividad fotosintética y respiratoria en las membranas del tilacoide. De hecho, algunos de los transportadores de electrones localizados en el tilacoide, como el pool de plastoquinonas, el complejo del citocromo  $b_6f$ , la plastocianina o el citocromo  $c$  participan tanto en la cadena de transporte fotosintético de electrones como en la respiración (Lea-Smith et al., 2016).

Otra característica particular del aparato fotosintético en cianobacterias es la composición en pigmentos, que contiene principalmente clorofila  $a$  y ficobilisomas. Los ficobilisomas son macrocomplejos compuestos mayoritariamente de ficobiliproteínas asociados a la membrana, pero no embebidos en ella, cuya función consiste en captar la luz y transferir la energía lumínica a los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) (Bailey & Grossman, 2008, Liu et al., 2013) (Figura 4). Estos pigmentos antena incluyen la ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina, los cuales absorben luz a diferentes longitudes de onda, maximizando la eficiencia fotosintética respecto a los pigmentos de plantas superiores. Además, las ficobiliproteínas pueden llegar a representar el 40-50 % de la proteína celular, por lo que constituyen importantes reservas de nitrógeno y carbono.

Durante la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, la excitación de estos pigmentos conduce el flujo fotosintético de electrones a través de la cadena fotosintética. Este proceso requiere la acción coordinada de ambos fotosistemas (PSI y PSII), que trabajando en serie generan el potencial electroquímico necesario para extraer los electrones del agua liberando  $O_2$ . (Figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de los componentes de la cadena fotosintética de transporte lineal de electrones de cianobacterias.** Fotosistema II (PSII), complejo generador de oxígeno (OEC), pool de plastoquinonas (pool PQ), citocromo  $b_6f$  (Cit  $b_6f$ ), plastocianina (PC), citocromo C6 (Cit C6), fotosistema I (PSI), ferredoxina (Fd), ferredoxina NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR). Ciclo de Calvin Benson Bassham (ciclo de CCB). La flecha punteada azul muestra el flujo de electrones y la flecha punteada negra la acumulación de los protones en el lumen tilacoidal.

Brevemente, el PSII oxida el agua y produce  $\text{O}_2$  liberando protones al lumen tilacoidal, el pool de plastoquinonas recibe los electrones del complejo generador de oxígeno y los transporta al complejo del citocromo  $b_6f$  (Cit  $b_6f$ ) el cual los cede al PSI a través de la plastocianina (PC) o el citocromo C6 (Cit C6), el cual transporta protones al lumen del tilacoide desde el citoplasma. Posteriormente desde el PSI, un electrón excitado por la luz es transferido a la ferredoxina (Fd), reduciendo finalmente NADP<sup>+</sup> a NADPH en el citoplasma gracias a la acción de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa (FNR) (Figura 4). El gradiente de protones a lo largo de la membrana tilacoidal se usa para producir ATP. Este ATP junto con el NADPH producido puede ser utilizado para la energía para la fijación de  $\text{CO}_2$  y la producción de triosas fosfato en el ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB) en el citoplasma (Vermaas, 2001). Además del transporte lineal de electrones fotosintético, las cianobacterias tienen otras rutas auxiliares de transporte de electrones que pueden utilizarse para el suministro de energía, como por ejemplo el transporte cíclico de electrones (Lea-Smith et al., 2016).

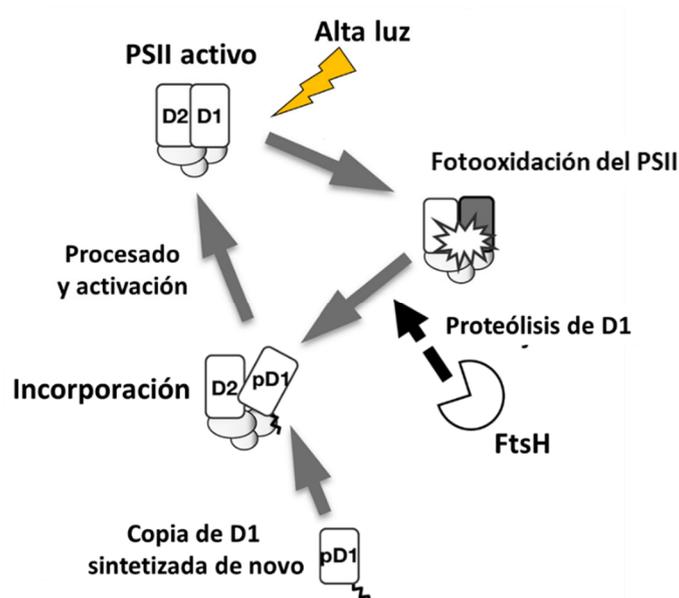
## 1.2. Estrategias adaptativas frente a diferentes estreses abióticos en cianobacterias

Como se comentaba anteriormente las cianobacterias han logrado colonizar un amplio rango de nichos ecológicos acuáticos y terrestres (Moreira et al., 2013). Este patrón de distribución tan

extenso se debe en gran parte a su capacidad para hacer frente a muchos tipos estreses abióticos. A continuación, se resumen y se contextualizan algunas de las estrategias moleculares adaptativas de las cianobacterias frente al estrés lumínico, estrés oxidativo y a la deficiencia de nutrientes como nitrógeno, carbono y hierro.

### 1.2.1. Adaptación de las cianobacterias al estrés por alta luz.

Cuando la energía absorbida por los complejos captadores de luz excede el límite de la energía consumida por la célula, se produce un exceso de energía que da lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden inhibir la fotosíntesis (fotoinhibición) y producir la degradación de los componentes celulares (Blokhina et al., 2003). Las cianobacterias presentan varios mecanismos fisiológicos para hacer frente a la fototoxicidad. Uno de los procesos más importantes para hacer frente a la fotooxidación es el ciclo de reparación del PSII. El proceso de fotoinhibición afecta principalmente al PSII (Ohad et al., 1992), en particular a la subunidad D1 del centro de reacción, la cual se conecta con varios cofactores involucrados en la transferencia de electrones a través de la membrana (Diner & Rappaport, 2002). Para mantener la actividad del PSII, es necesaria la existencia de un ciclo de reparación en el que se produce el remplazamiento del polipéptido D1 dañado por una copia sintetizada *de novo* (Figura 5). (Kyle et al., 1984, Ohad et al., 1984, Aro et al., 2005).



**Figura 5. Representación esquemática de la implicación de FtsH en el ciclo de reparación del PSII dañado.** La proteína D1 sufre daño en respuesta a alta luz. La proteína D1 dañada se degrada por la proteasa FtsH y posteriormente remplazada por una copia sintetizada nuevamente. D1 y D2 proteínas del PSII, pD1: precursor de la proteína D1. Adaptado de (Ohnishi, 2017).

La familia de metaloproteasas de unión a zinc FtsH son proteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia AAA+ y desempeñan un papel clave en la degradación de D1 en el ciclo de reparación del PSII de cloroplastos y cianobacterias (Kato & Sakamoto, 2018, Ito & Akiyama, 2005). Los genomas de cianobacterias tienen múltiples homólogos FtsH. La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 presenta cuatro proteasas FtsH: FtsH1 (*slr1390*), FtsH2 (*slr0228*), FtsH3 (*slr1604*) and FtsH4 (*slr1463*). Estudios de un mutante de delección de FtsH2 evidenciaron su papel en la degradación del polipéptido D1 durante el ciclo de reparación del PSII (Silva et al., 2003, Komenda et al., 2006) y en la degradación de algunas de las subunidades del PSII (Komenda et al., 2006). Además, estudios posteriores confirmaron que las proteasas FtsH de *Synechocystis* sp. PCC6803 pueden formar complejos hexaméricos en la membrana (Boehm et al., 2012), revelando que FtsH2 formaba complejo con FtsH3 y confirmó que ambas estaban activamente involucradas en la degradación del polipéptido D1 en el ciclo de reparación del PSII (Boehm et al., 2012). Asimismo, en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 se han identificado también 4 proteasas FtsH codificadas por los genes *alr1262*, *all3642*, *all4776* y *all4936*, sin embargo se desconoce la función específica de cada una (Gong & Xu, 2012).

Además del ciclo de reparación del PSII, un segundo mecanismo fotoprotector en cianobacterias es el desmantelamiento los ficobilisomas (Kirilovsky et al., 2014). En situaciones de estrés por alta luz, los ficobilisomas pueden desmantelarse parcialmente (Tamary et al., 2012, Stoitchkova et al., 2007), separándose funcional o físicamente de los centros de reacción, con el objetivo de reducir la captación de luz (Tamary et al., 2012, Stoitchkova et al., 2007, Kana et al., 2009). Un tercer mecanismo de protección corresponde con el denominado NPQ (Non Photochemical Quenching) realizado entre otras proteínas por las *orange carotenoid protein* (OCP) que se encargan de disipar la energía que llega al centro de reacción del PSII y a los ficobilisomas (Stadnichuk et al., 2013, Niyogi & Truong, 2013)

### **1.2.2. Respuesta a estrés oxidativo en cianobacterias**

La acumulación de oxígeno en la atmósfera primitiva gracias a la aparición de la fotosíntesis oxigénica condujo al desarrollo del metabolismo aeróbico que utiliza el oxígeno como aceptor de electrones y genera inevitablemente como subproducto las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, dada la naturaleza fotosintética de las cianobacterias, la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) está especialmente incrementada en condiciones de alta intensidad de luz (Latifi et al., 2009). Algunas de las ROS más importantes son el ion superóxido

( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (Latifi et al., 2009, Imlay, 2008). Las tres especies presentan diferencias en su reactividad, sus dianas y su toxicidad. En organismos fotosintéticos, El  $O_2^-$  se produce principalmente en el PSI a través de la reacción de Mehler. El radical superóxido generalmente oxida los grupos sulfoférricos de las proteínas provocando la liberación de  $Fe^{2+}$ . Por otro lado, la principal fuente de  $H_2O_2$  es la dismutación del  $O_2^-$ , ya sea de forma espontánea o inducida por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y se produce igualmente en cianobacteria por una oxidación incompleta del agua en el PSII. El  $H_2O_2$  es la especie menos reactiva, pero su reacción con el  $Fe^{2+}$  a través de la reacción de Fenton la convierte en una fuente de radicales  $OH\cdot$  que son altamente reactivos y capaces de dañar directamente el DNA. Además, el  $H_2O_2$  también es capaz de oxidar los grupos tiol de las cisteínas. Las cianobacterias han desarrollado toda una serie de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Entre los más importantes se encuentran las defensas enzimáticas.

#### **1.2.2.1. Defensas enzimáticas frente a estrés oxidativo en *Anabaena* sp. PCC7120**

*Anabaena* sp. PCC7120 presenta varias enzimas involucradas en la defensa frente al estrés oxidativo, entre las que se encuentran las enzimas superóxido dismutasas (SOD), las Mn catalasas y las peroxirredoxinas.

Las superóxido dismutasas (SOD) catalizan la dismutación de dos moléculas de ion superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno. Estas enzimas requieren de un cofactor metálico para llevar a cabo su acción. En *Anabaena* sp. PCC7120 se han identificado dos superóxido dismutasas, una de ellas dependiente de manganeso denominada MnSOD (SodA) y otra dependiente de hierro o FeSOD (SodB). Estas enzimas difieren también en su localización celular, FeSOD es soluble y se encuentra en el citosol, mientras que MnSOD se encuentra principalmente asociada a la membrana tilacoidal, protegiéndola del daño oxidativo causado por iones superóxido (Li et al., 2002, Zhao et al., 2007a). Concretamente, MnSOD podría ejercer un papel más importante bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, ya que se ha observado que es necesaria para el mantenimiento de la actividad nitrogenasa y el crecimiento óptimo de *Anabaena* sp. PCC7120 en deficiencia de nitrógeno combinado (Zhao et al., 2007a).

Así mismo, las cianobacterias contienen catalasas, que descomponen el  $H_2O_2$  dando lugar a oxígeno y agua. Estas enzimas se han clasificado en 3 grupos: catalasas monofuncionales, catalasas-peroxidasas bifuncionales (KatG) y catalasas dependientes de manganeso. *Anabaena* sp. PCC7120, al contrario que otras cianobacterias unicelulares no diazotróficas como *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus* sp. PCC7942, no presenta catalasas de tipo

bifuncional, si no que únicamente expresa dos catalasas dependientes de manganeso, Alr0998 y Alr3090 (Banerjee et al., 2012a). Las catalasas dependientes de manganeso, al contrario que las catalasas monofuncionales y las catalasas-peroxidadas bifuncionales, contienen dos átomos de manganeso en su centro activo en lugar de hemo y además presentan una menor actividad. Sin embargo, se han propuesto como uno de los mecanismos de adaptación frente a condiciones de deficiencia de hierro (Whittaker, 2012). Respecto a Alr0998 (CatA), se ha observado que su sobreexpresión en *Anabaena* sp. PCC7120 aumenta la resistencia al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y provoca la disminución de los niveles de ROS intracelulares (Banerjee et al., 2012a). En cuanto a Alr3090 (CatB), se ha observado que su expresión aumenta al cabo de una hora cuando se somete a *Anabaena* sp. PCC7120 a desecación (Kato, 2012) y en condiciones de deficiencia de hierro (Narayan et al., 2011), situación que se ha demostrado que induce estrés oxidativo en *Anabaena* sp. PCC7120 (Latifi et al., 2005).

Por último, las peroxirredoxinas o alquilhidroperoxidadas, son un tipo de peroxidadas encargadas de reducir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alquilhidroperóxidos y peroxinitrito usando agentes reductores que contienen tioles como donadores de electrones (Poole et al., 2004). Todas las peroxirredoxinas tienen un mecanismo de acción similar. Una primera etapa en la que se produce la oxidación de una cisteína del extremo N-terminal de la enzima a ácido sulfénico y una segunda etapa, en la que el ácido sulfénico es reducido a tiol antes de que comience un nuevo ciclo catalítico. Dependiendo de cómo tiene lugar el proceso de regeneración del ácido sulfénico y del número y posición de las cisteínas que contienen, las peroxirredoxinas se clasifican en tres tipos: 1-Cys Prxs, 2-Cys Prxs típicas, y las 2-Cys Prxs atípicas (Wood et al., 2003):

- **2-Cys Prx-s:** forman homodímeros. El ácido sulfénico formado en una de las subunidades es reducido por la cisteína localizada en el extremo C-terminal de la otra subunidad. Como consecuencia de esa reacción se forma un puente disulfuro entre las dos subunidades que es reducido luego por tiorredoxinas y glutarredoxinas.
- **1-Cys Prx-s:** el puente disulfuro es regenerado por una proteína que contiene un grupo tiol, pero el mecanismo aún no ha sido dilucidado.
- **2-Cys Prx-s atípicas:** a diferencia de las primeras, son monoméricas. Aun así, el mecanismo de funcionamiento es muy similar, siendo el ácido sulfénico reducido por una cisteína localizada en la misma cadena polipeptídica. Dentro de este grupo, aquellas que presentan similitud de secuencia con la proteína comigratoria de bacterioferritina de *E. coli* (BCP) se han denominado subclase PrxQ.

El genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 contiene siete genes que codifican proteínas semejantes a las peroxirredoxinas de tipo 2-Cys Prx-s; (*alr4641*), 1-Cys Prx-s (*alr4404*), 2-Cys Prx-s atípicas (*all1541*) y PrxQ (*all2556*, *alr2503*, *alr2375*, *alr3183*) (Cui et al., 2012, Banerjee et al., 2013). Estas peroxirredoxinas inducen su transcripción bajo diferentes condiciones de estrés como la presencia de t-butyl hidroperóxido, diamida, estrés salino (Cha et al., 2007), metil viológeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Banerjee et al., 2012b), lo que podría ser una estrategia adaptativa para combatir de manera efectiva las diversas situaciones de estrés a las que se ve sometida la célula a lo largo de su crecimiento (Banerjee et al., 2013).

#### 1.2.2.2. Principales sistemas de regulación de la respuesta al estrés oxidativo

Las bacterias expresan diferentes reguladores transcripcionales que perciben el incremento en la concentración de ROS y modulan la respuesta al estrés oxidativo principalmente a nivel transcripcional. Esencialmente, los sistemas más relevantes son SoxRS, OxyR y PerR (Latifi et al., 2009) (Rachedi et al., 2020). En cianobacterias únicamente se han encontrado homólogos de PerR (Peroxide responde Regulator). Concretamente, PerR se identificó en *Synechocystis* sp. PCC6803 como el producto del gen *slr1738* (Li et al., 2004). En *Anabaena* sp. PCC7120 también se ha descrito un posible regulador PerR (la proteína FurC objeto de este estudio), que está codificada por el gen *alr0957* (Yingping et al., 2014). Las proteínas PerR son reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia FUR en cuyo mecanismo de acción se integran la respuesta a la disponibilidad de metales (Mn<sup>2+</sup>/Fe<sup>2+</sup>) y la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sevilla et al., 2021). En el apartado 1.5 se describirán en detalle las características y el mecanismo de actuación de las proteínas PerR.

Además de PerR, en cianobacterias existen otros reguladores que modulan la respuesta concertada a estrés oxidativo. Entre ellos, FurA y FurB (Zur), los otros miembros de la familia FUR presentes en *Anabaena* sp. PCC7120, en cuyos regulones se incluye un número relevante de genes relacionados con la respuesta a ROS y el mantenimiento del estado redox de la célula (Gonzalez et al., 2011, Gonzalez et al., 2016) (Sein-Echaluze et al., 2014). Por otra parte, se ha descrito que el regulador de tipo AbrB, CalA, reprime directamente la expresión de *sodB*. Sin embargo, el mecanismo por el cual CalA percibe el anión superóxido está aún por determinar. Además de los mecanismos de regulación mencionados, la respuesta de *Synechocystis* al estrés oxidativo promovido por alta luz o tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también incluye la actuación de los factores Sigma del grupo 2, SigB y SigD. Una cepa mutante deficiente en todos los factores sigma del grupo 2 era incapaz de tolerar el estrés oxidativo. Sin embargo, esta habilidad se restauró tras la complementación con los genes *sigB* y *sigD*. Además, la holoenzima de la RNA polimerasa

asociada con SigB o SigD se acumula en respuesta al estrés por peróxido. Para más información acerca de estos mecanismos se puede consultar la reciente revisión (Rachedi et al., 2020))

### **1.2.3. Respuesta a la deficiencia de nitrógeno en *Anabaena* sp. PCC7120**

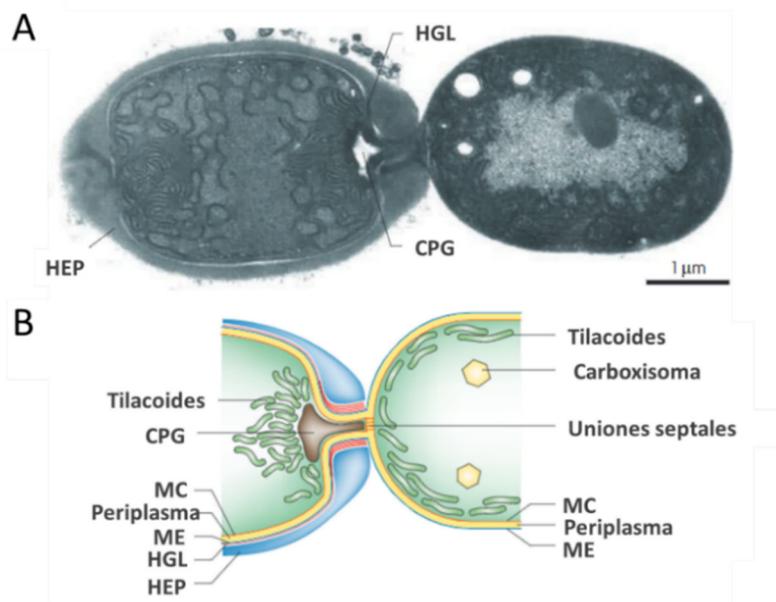
Las cianobacterias utilizan principalmente como fuente de nitrógeno compuestos inorgánicos como amonio, nitrato y nitrito. También pueden metabolizar moléculas simples como la urea, algunos aminoácidos como la glutamina y la arginina, y bases nitrogenadas (Flores & Herrero, 1994). Además, algunas especies como *Anabaena* sp. PCC7120, en condiciones limitantes de nitrógeno combinado, son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. A la hora de emplear distintas fuentes de nitrógeno, existe una jerarquía en el orden de utilización, asimilando preferentemente aquellas que implican un menor consumo energético, como es el caso del amonio que es incorporado al esqueleto carbonado de la molécula de 2-oxoglutarato por medio del ciclo GS-GOGAT (Wolk et al., 1976) (Meeks et al., 1978, Flores & Herrero, 1994). El mecanismo de regulación para esta jerarquía se denomina “control por nitrógeno” (Herrero et al., 2001, Herrero & Flores, 2019) y está dirigido principalmente por la proteína NtcA, un regulador transcripcional que activa o reprime genes implicados en la asimilación y fijación de nitrógeno en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado.

#### **1.2.3.1. Fijación de nitrógeno y heterocistos**

La fijación de nitrógeno atmosférico en cianobacterias diazotróficas se realiza a través de la enzima nitrogenasa, un complejo multiprotéico que cataliza la reducción de N<sub>2</sub> hasta amonio (Seefeldt et al., 2009). La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, por lo que la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica son dos procesos incompatibles. Su existencia conjunta ha requerido del diseño de estrategias que hagan posible el funcionamiento de ambos procesos antagónicos para proteger a la nitrogenasa frente al oxígeno (Fay, 1992, Flores & Herrero, 1994). Entre tales estrategias, se encuentran la separación en el tiempo o en el espacio. La más común en cianobacterias no formadoras heterocistos es la separación temporal, llevando a cabo la fotosíntesis oxigénica durante las horas de luz y la fijación de nitrógeno atmosférico en oscuridad (Huang et al., 1999, Reade et al., 1999, Misra & Tuli, 2000). Por otra parte, las cianobacterias formadoras de heterocistos, como *Anabaena* sp. PCC7120, llevan a cabo una separación espacial de ambos procesos mediante la diferenciación de células enormemente especializadas en la fijación del nitrógeno en ambientes aeróbicos, los heterocistos. Estas células se diferencian a partir de determinadas células vegetativas, situadas a espacios semirregulares a lo largo del filamento de, aproximadamente, 1 cada 10 células vegetativas (Golden & Yoon,

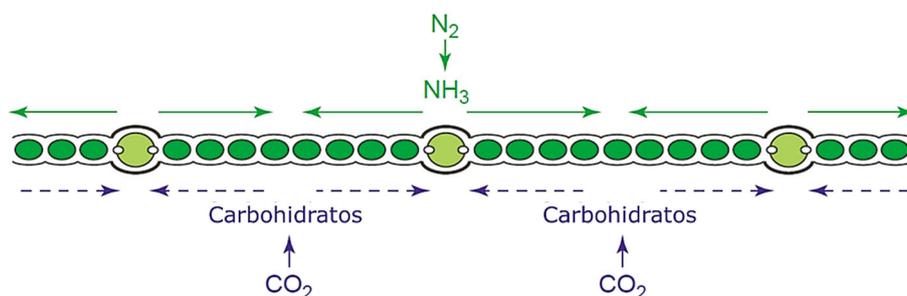
2003, Adams & Duggan, 1999). Este proceso que provoca cambios drásticos en la cianobacteria, tanto estructurales como funcionales que están encaminados a aumentar la eficacia del proceso de fijación y a la protección frente al oxígeno, tanto ambiental como el generado por la fotosíntesis oxigénica. Entre estas modificaciones se incluyen:

- La formación de dos gruesas envueltas celulares adicionales específicas del heterocisto, una interna formada por glicolípidos (capa HGL) y otra externa formada por polisacáridos (capa HEP) que impiden la difusión de oxígeno al interior celular (Figura 6). La capa de polisacáridos específicos de heterocisto HEP *heterocyst-envelope polysaccharide* es la primera en producirse. Por otro lado, la capa HGL *heterocyst-specific glycolipids* se produce debajo de la capa HEP. Se cree que la capa HGL restringe la difusión de gases, por la tanto representando una barrera para la entrada de oxígeno y la capa HEP actúa protegiendo a la capa HGL (Awai et al., 2009).
- El desmantelamiento del PSII para evitar la producción de oxígeno, lo que da lugar a la pérdida de pigmentos fotosintéticos (Donze et al., 1972, Magnuson, 2019) y la reorganización de los tilacoides (Figura 6). La disminución en pigmentos provoca que el heterocisto tenga una pigmentación más débil que las células vegetativas.
- La formación de gránulos polares de cianoficina (CPG) que se forman en los puntos de unión del heterocisto con la célula vegetativa y sirven como reserva de nitrógeno (Figura 6).
- Se incrementa la actividad oxidasa, de manera que las moléculas de oxígeno que atraviesan la envuelta son consumidas rápidamente.
- Se pierde la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> al no expresarse la enzima RuBisCO (Winkenbach & Wolk, 1973, Stewart & Codd, 1975) lo que garantiza que la energía y el poder reductor obtenidos no se emplean en otros procesos diferentes a la fijación de nitrógeno.



**Figura 6. Características morfológicas y estructurales del heterocisto.** A) Micrografía de un heterocisto y una célula vegetativa adyacentes de *Anabaena* sp. PCC7120. B) Representación esquemática de las diferencias estructurales del heterocisto y las células vegetativas. CPG (Gránulos de cianoficina), MC (Membrana citoplasmática), ME (Membrana externa), HEP (Capa de polisacáridos del heterocisto), HGL (Capa de glicolípidos del heterocisto). Adaptado de (Flores & Herrero, 2010)

Puesto que las células vegetativas no pueden fijar nitrógeno y que el heterocisto es incapaz de llevar a cabo la fotosíntesis de forma completa, el correcto mantenimiento del metabolismo del filamento en condiciones de fijación de nitrógeno se consigue gracias al intercambio de compuestos nitrogenados desde los heterocistos a las células vegetativas, y de compuestos reducidos de carbono desde estas hacia los heterocistos (Muro-Pastor & Hess, 2012) (Herrero et al., 2016) (Figura 7).



**Figura 7. Representación esquemática del flujo de nutrientes entre los heterocistos y las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC7120.** Adaptado de (Golden & Yoon, 2003).

Este intercambio es posible gracias a la existencia de las uniones septales y del periplasma funcionalmente continuo (apartado 1.1.4). En los heterocistos, los carbohidratos obtenidos en las células vegetativas se degradan principalmente mediante la vía oxidativa de las pentosas fosfato, obteniendo energía y poder reductor necesario para, entre otros procesos, la fijación de nitrógeno por la nitrogenasa (Magnuson, 2019).

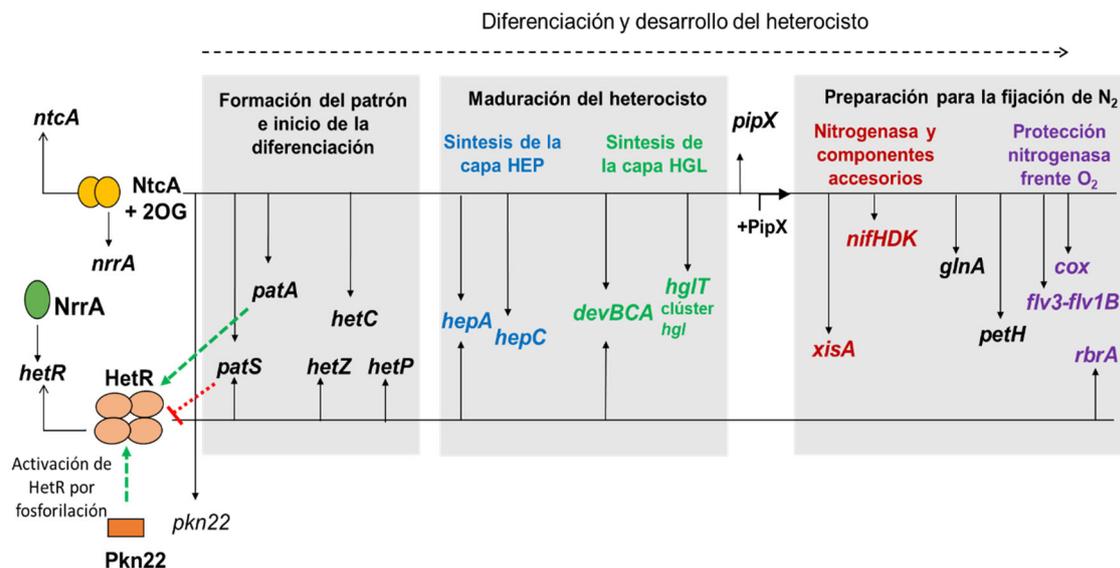
#### **1.2.3.2. Control transcripcional de la diferenciación y desarrollo del heterocisto**

El balance C/N es detectado por el regulador global del nitrógeno NtcA mediante su interacción alostérica con la molécula de 2-OG. Dado que el 2-OG es un intermediario del ciclo de Krebs, el ciclo GS-GOGAT constituye una conexión entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno. La deficiencia de nitrógeno conlleva a la inhibición del ciclo GS-GOGAT, y a su vez a la acumulación del 2-OG, el cual funciona como molécula indicadora de los niveles de nitrógeno en la célula (Muro-Pastor et al., 2001), favoreciendo la unión de NtcA con los promotores por los que presenta baja afinidad (Vázquez-Bermúdez et al., 2002; Zhao et al., 2010). De este modo, los niveles elevados de 2-oxoglutarato que se acumulan en condiciones de deficiencia de nitrógeno estimulan la unión de NtcA a sus promotores, controlando la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno y en la incorporación de amonio. Además, en cianobacterias formadoras de heterocistos, la activación de NtcA permitirá que se inicie la compleja cascada de regulación hacia la diferenciación del heterocisto, donde también regulará genes relacionados con la fijación de nitrógeno atmosférico.

A su vez, la actividad de NtcA es modulada por la proteína PipX, presente únicamente en cianobacterias y la cual actúa como coactivador de NtcA estabilizando su conformación activa (Espinosa et al., 2006). Además de NtcA, existe un segundo sensor del 2-OG, la proteína PII (codificada por el gen *glnB*) que está presente en todos los genomas cianobacterianos (Forcada-Nadal et al., 2018). Las proteínas PII constituyen una de las familias de factores de transducción de señal. Son capaces de unir ATP/ADP además de 2-OG vía interacción proteína-proteína. PII es capaz de controlar la actividad de otras proteínas en respuesta a los niveles de ADP/ATP y 2-OG, lo que supone una regulación cruzada entre los metabolismos del carbono y nitrógeno (Forchhammer & Lüddecke, 2016). Cuando la fuente de nitrógeno es abundante (y los niveles de 2-OG dentro de la célula son bajos), PII-ADP se une a PipX y además NtcA se encuentra principalmente en su forma apo. Por otro lado, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, los niveles intracelulares de 2-OG aumentan, PII interacciona con 2-OG y ATP, inhibiendo su interacción con PipX. Al mismo tiempo la unión de NtcA con el 2-OG favorece su interacción con la proteína PipX libre, lo que promueve la activación transcripcional vía NtcA de genes

involucrados en la asimilación de nitrógeno (Llácer et al., 2010, Zhao et al., 2010). Además de estas vías de regulación, se ha descrito que la respuesta a la deficiencia de nitrógeno también puede ser regulada por mecanismos postranscripcionales como la acción de los RNA reguladores pequeños NsR1 y NsRi4, los cuales están bajo el control de NtcA de *Anabaena* sp. PCC7120 y en *Synechocystis* sp. PCC6803 y están involucrados en la regulación de genes relacionados con el crecimiento diazotrófico (Álvarez-Escribano et al., 2020, Álvarez-Escribano et al., 2018, Klähn et al., 2015).

Los cambios drásticos morfológicos y metabólicos que ocurren en la célula vegetativa durante su diferenciación a heterocisto (apartado 1.5), son promovidos a través de la activación secuencial de la expresión de genes estructurales, y reguladores específicos del heterocisto hasta llevar a cabo la diferenciación del heterocisto maduro. Aunque existen multitud de reguladores transcripcionales involucrados en la compleja red de regulación de este proceso, los más importantes corresponden con el regulador global del metabolismo del nitrógeno NtcA y el regulador HetR, un regulador específicamente implicado en la diferenciación celular (Buikema y Haselkorn, 1991; Black et al., 1993). En la Figura 8 se resume la regulación ejercida por ambos reguladores transcripcionales lo largo del proceso.



**Figura 8. Esquema general de la activación transcripcional de un grupo de genes seleccionados durante la diferenciación de heterocistos ejercida por HetR y NtcA.** Los genes representados de izquierda a derecha corresponden a genes expresados en las diferentes etapas de la diferenciación y desarrollo del heterocisto, desde la etapa temprana a la tardía del proceso. En la parte izquierda se representa la correlación entre NtcA, NrrA, Pkn22 y HetR. Las flechas negras indican activación transcripcional. Las flechas verdes la activación mediante interacción proteína-proteína o fosforilación y las flechas verdes la inhibición mediante interacción proteína-proteína. Figura basada en (Flores et al., 2019).

Así, tras la activación de la proteína NtcA por 2-OG, esta promueve el inicio de la diferenciación del heterocisto activando la expresión de *hetR* de forma indirecta, vía NrrA (Ehira & Ohmori, 2006a, Herrero et al., 2001). HetR induce la expresión de varios genes clave para el proceso de diferenciación como *patS*, *hetP*, *hetZ*, y *hepA* (Muro-Pastor & Hess, 2012) y regula su propia expresión y la de *ntcA* (Herrero et al., 2004). HetR es uno de los primeros genes inducidos durante la diferenciación a heterocistos, su transcripción se induce después de tan sólo 30 minutos de la deficiencia de nitrógeno en todas las células del filamento. Sin embargo, entre 3 y 4 horas más tarde, su expresión resulta sólo confinada a las células que se diferenciarán a heterocistos, cumpliendo el típico patrón de espaciamiento comentado anteriormente (Black et al., 1993). El modelo propuesto para la formación del patrón regular de heterocistos establece que las células en proceso de diferenciación producen unas señales inhibitoras (PatS, HetN) capaces de interactuar con HetR afectando negativamente a su unión al DNA. Estas señales difunden a lo largo del filamento, formando un gradiente que inhibe la diferenciación de las células vecinas de manera dependiente a la concentración (Borthakur et al., 2005). Por otro lado, existen otras señales de activación como PatA que interactúan con HetR bloqueando las señales de inhibición de la diferenciación de heterocistos (Orozco et al., 2006) y que es activada por NtcA (Bastet et al., 2010) (Figura 8). Además, un estudio reciente ha revelado la participación de nuevas proteínas en este proceso: la proteína PatX que actúa como otra señal inhibitoria (Khudyakov et al., 2020) y HetL que es una señal activadora de la diferenciación (Xu et al., 2020). Además de este mecanismo de regulación de HetR, también se ha descrito su fosforilación por parte de la proteína quinasa Pkn22, que a su vez está bajo el control de NtcA, y que parece ser necesaria para que HetR adopte la conformación activa para unirse al DNA y llevar a cabo la diferenciación de heterocistos (Valladares et al., 2016, Roumezi et al., 2019) (Figura 8).

Una vez establecido el patrón de diferenciación, HetR activa la expresión de *hetZ* y *hetP* (Figura 8). Se ha propuesto que HetP es capaz de interactuar con HetR permitiendo la activación de los genes necesarios para la maduración del heterocisto, mientras que HetZ es un regulador transcripcional necesario, junto con HetR, para la expresión de HetP (Zhang et al., 2018b). A su vez, en esta etapa NtcA activa también la expresión *hetC*, gen esencial que codifica un transportador de tipo ABC necesario para la diferenciación del heterocisto (Muro-Pastor et al., 1999) (Figura 8). En el siguiente paso de la cascada de regulación participan los genes que codifican proteínas relacionadas con la maduración del heterocisto, etapa en la que se forman las capas HEP y HGL. Entre las proteínas involucradas en la síntesis de la capa HEP, la glicosiltransferasa HepC está regulada por NtcA y el transportador de tipo ABC de la deposición de polisacáridos HepA, está regulado por NtcA y HetR. La síntesis de la envuelta de glicolípidos

depende de la expresión de, entre otros, genes del clúster *hgl* como *hglT* y de *devBCA*. La expresión de *hglT* y otros genes del clúster *hgl* está directamente regulada por NtcA. A su vez, el operón *devBCA* el cual codifica las subunidades de un transportador de tipo ABC implicado en la deposición de los glicolípidos de la capa Hgl, está regulado coordinadamente por NtcA y HetR (Flores et al., 2019) (Figura 8).

Una vez completada la maduración del heterocisto, NtcA activa en los heterocistos la expresión de diferentes genes. Por un lado, al operón *nifHDK* que codifica las subunidades estructurales de la nitrogenasa y a la recombinasa *xisA* encargada de la escisión de los fragmentos genéticos que interrumpen la transcripción del operón *nifHDK* (Herrero, 2013) (Figura 8). Además, NtcA activa la transcripción del gen *glnA* que codifica la glutamina sintetasa. Por otro lado, otra proteína cuya expresión es mucho mayor en el heterocisto que en las células vegetativas es la FNR ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa, codificada por el gen *peth*, y que también está regulada por NtcA (Valladares et al., 1999, Razquin et al., 1996). Por último, para aliviar la tensión de oxígeno en el heterocisto, NtcA también activa la expresión de genes de las oxidasas Cox y las flavoproteínas Flv3 y FlvB1 encargadas de reducir el oxígeno que entra en la célula (Fay, 1992, Ermakova et al., 2013) (Figura 8). La regulación transcripcional ejercida por NtcA en esta etapa se cree que se realiza estando coactivada con PipX, dadas las características del sitio de unión a NtcA en los promotores. Además de los genes regulados por NtcA, en la etapa final HetR también regula la transcripción de la rubreritrina RbrA, una peroxidasa dependiente de FNR que se encarga de proteger a la nitrogenasa de las especies reactivas de oxígeno (Zhao et al., 2007b) (Figura 8).

Aparte de los reguladores NtcA y HetR existen otra multitud de proteínas con funciones reguladoras implicadas en el proceso de la diferenciación del heterocisto, aunque la regulación precisa de estos sistemas no está bien caracterizada. Algunos de estos reguladores son Asr1734, un regulador transcripcional inhibidor del desarrollo del heterocisto (Wu et al., 2007), DevR un regulador de respuesta que modula genes involucrados en la etapa de maduración del heterocisto (Hagen & Meeks, 1999), el regulador transcripcional de tipo AbrB CalA, que actúa como represor de los genes *hepA* y *hetP*, esenciales para la formación del heterocisto (Higo et al., 2019) y el regulador FurA de la familia FUR (Ferric Uptake Regulator) que está regulado y regula a NtcA y cuyo regulón comparte varias dianas con el de NtcA (Lopez-Gomollon et al., 2007, Gonzalez et al., 2013)

## 1.2.4. Adaptación a la limitación de carbono en cianobacterias

### 1.2.4.1. Fijación de CO<sub>2</sub> y mecanismos CCM

El proceso de fijación del CO<sub>2</sub> se realiza a través de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), una puerta de entrada al ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB). La RuBisCO se considera una de las enzimas más abundantes en la Tierra. Tiene actividad bifuncional dado que puede usar CO<sub>2</sub> (carboxilasa) u O<sub>2</sub> (oxigenasa) como sustrato. La reacción de la carboxilasa incorpora una molécula de CO<sub>2</sub> en una molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA). Estas moléculas siguen reduciéndose hasta dar lugar a esqueletos carbonados que sirven a la cianobacteria para sus procesos biosintéticos. Sin embargo, La RuBisCO presenta mayor afinidad por el O<sub>2</sub> que por el CO<sub>2</sub>, por lo que su tendencia es funcionar como oxigenasa, catalizando la incorporación de una molécula de O<sub>2</sub> a la ribulosa 1,5-bisfosfato para generar 2-fosfoglicolato (2-PG). Este compuesto entra en las rutas fotorrespiratorias liberando CO<sub>2</sub> provocando la pérdida del C<sub>i</sub> fijado (Allahverdiyeva et al., 2011, Kroth, 2015). Para contrarrestar este problema e incrementar la eficiencia de la RuBisCO en la fijación de CO<sub>2</sub>, las cianobacterias han desarrollado distintos sistemas de concentración de CO<sub>2</sub> en sus inmediaciones para así favorecer su actividad carboxilasa (Burnap et al., 2015). Estos mecanismos se denominan CCM (*CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanism*) e incluyen: la presencia de transportadores de CO<sub>2</sub> y de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que pueden concentrar hasta 1.000 veces los niveles de carbono inorgánico en el citosol (Kaplan & Reinhold, 1999, Giordano et al., 2005); la existencia de anhidrasas carbónicas que catalizan la interconversión entre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>2</sub>; y el confinamiento de las enzimas RuBisCO y anhidrasa carbónica en el carboxisoma (Kerfeld & Melnicki, 2016).

### 1.2.4.2. Control transcripcional de la respuesta a limitación de carbono inorgánico y control del balance C/N.

El carbono inorgánico resulta ser limitante en la mayoría de los hábitats de las cianobacterias. En deficiencia de carbono, se activan los genes de los sistemas CCM y de las subunidades estructurales de la RuBisCO (Price et al., 2008, Jiang et al., 2018). En *Synechocystis* sp. PCC6803, los elementos del CCM están principalmente bajo el control de dos reguladores transcripcionales de tipo LysR (LTTR) denominados CmpR, y NdhR (Jiang et al., 2018). En situaciones de deficiencia de carbono inorgánico, CmpR actúa como un activador transcripcional de la expresión del operón *cmp*, que codifica las subunidades de un transportador de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tipo ABC (Omata et al., 2001). Se ha descrito que su afinidad por el DNA aumenta tras la adición de

RuBP o 2-PG (Nishimura et al., 2008, Daley et al., 2012), metabolitos cuyos niveles aumentan en condiciones de deficiencia de CO<sub>2</sub>. Por el contrario, el regulador transcripcional NdhR funciona como represor de genes que codifican los transportadores de carbono como *sbtA*, *bicA* y *ndhF3* y de su propio gen (Wang et al., 2004). NdhR es capaz de modular su actividad como represor uniéndose entre otros los metabolitos 2-PG y 2-OG con diferente actividad, mientras que el 2-OG aumenta su afinidad por el DNA, el 2-PG la disminuye (Jiang et al., 2018). Así en una situación de deficiencia de carbono con bajos niveles de 2-OG y altos niveles de 2-PG, la proteína estaría unida a 2-PG y por lo tanto tendría menos afinidad de unión a sus promotores, produciendo la desrepresión de su regulón.

*Anabaena* sp. PCC7120 también se ha descrito un regulador CmpR (Lopez-Igual et al., 2012). En esta cianobacteria la expresión del operón *alr2877-alr2880*, que codifica el sistema de transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tipo ABC Cmp, se induce en condiciones de limitación de carbono inorgánico. En estas condiciones también se induce el gen *all0862 (cmpR)*. De este modo, se propuso a All0862 como el regulador CmpR por ser requerida para la inducción del transportador Cmp de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en *Anabaena* sp. PCC7120 (Lopez-Igual et al., 2012). Además, se ha publicado que CmpR es reprimida por NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno lo que también conecta la regulación de los metabolismos del nitrógeno y el carbono en *Anabaena* sp. PCC7120 (Lopez-Igual et al., 2012). Este sistema supone un nuevo modo de co-regulación para la disponibilidad de C y N, además del comentado anteriormente entre NtcA, PipX y PII, a través de la acción concertada de los factores de transcripción que responden a estos nutrientes.

### 1.2.5. Control de la homeostasis del hierro

El hierro es un componente esencial requerido para el crecimiento y el desarrollo de la mayoría de los seres vivos, incluidos los microorganismos (Hantke, 2001). Este metal juega un papel clave en varios procesos bioquímicos como la fotosíntesis, respiración, fijación de nitrógeno, síntesis del DNA y múltiples reacciones redox (Straus, 1994, Kranzler et al., 2014, Andrews et al., 2003, Gonzalez et al., 2016b) (Boyer et al., 1987, Straus, 1994, Ferreira & Straus, 1994, Behrenfeld & Kolber, 1999, Raven et al., 1999, Richardson, 2000, Andrews et al., 2003, Shcolnick & Keren, 2006, Gonzalez et al., 2016b). Por todo ello, no es de extrañar que el control de la respuesta a diferentes estreses por alta luz o de deficiencia de nutrientes deba estar acompañado de una estrecha regulación de la homeostasis del hierro. Por ejemplo, procesos como la fotosíntesis o la fijación de nitrógeno son estrictamente dependientes del hierro. En cianobacterias, el aparato fotosintético requiere de un total de 22 átomos hierro (Baniulis et al.,

2008, Ferreira & Straus, 1994) (Ferreira and Straus 1994; Baniulis et al. 2008). Además, el complejo nitrogenasa y nitrogenasa reductasa alberga alrededor de 40 átomos de  $\text{Fe}^{2+}$  (Hernandez et al., 2008) (Rubio & Ludden, 2008).

A pesar de que el hierro funciona como cofactor en multitud de proteínas esenciales, el hierro libre no se encuentra disponible en la naturaleza, lo que le convierte en un factor limitante para el crecimiento de bacterias y fitoplancton en numerosos hábitats (Wandersman & Delepelaire, 2004). Las cianobacterias y en general los microorganismos han desarrollado varias estrategias para hacer frente a la limitación de hierro. Entre ellas destacan la reducción de estructuras celulares y actividades fisiológicas, el reemplazo de enzimas que contienen hierro por otras sin hierro funcionalmente similares y la mejora de la adquisición e incorporación de hierro (González et al., 2018, Ferreira & Straus, 1994, Straus, 1994). Se han descrito diferentes sistemas de captura, transporte y almacenamiento de hierro en cianobacterias y que están presente en las demás bacterias (Qiu et al., 2022, Andrews et al., 2003). En determinadas condiciones, las cianobacterias producen moléculas de bajo peso molecular quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$  denominadas sideróforos y los liberan al medio extracelular. Una vez capturan las moléculas de hierro, los sideróforos se unen a receptores específicos de membrana para su internalización al citosol a través de los transportadores dependientes de TonB (Qiu et al., 2022). Además de este sistema, existen mecanismos independientes de la síntesis de sideróforos como los transportadores de  $\text{Fe}^{2+}$  como FeoB (Andrews et al., 2003) o los transportadores de  $\text{Fe}^{3+}$  de tipo ABC como FutABC o el sistema Fec (Nicolaisen et al., 2010b, Stevanovic et al., 2012, Qiu et al., 2022). Una vez internalizado, el hierro puede ser utilizado para el ensamblaje de cofactores como hemo, citocromos o grupos sulfoféricos (Kranzler et al., 2013). De forma alternativa, el hierro puede almacenarse dentro de las células con la ayuda de diferentes proteínas, como las clásicas ferritinas, las bacterioferritinas y las proteínas Dps (Andrews et al., 2003).

El control de la expresión de estas proteínas implicadas en la homeostasis del hierro debe estar estrechamente regulado para prevenir tanto la deficiencia como el exceso de este nutriente, situaciones que conducen al estrés oxidativo en las cianobacterias (Latifi et al., 2009). El regulador Fur, perteneciente a la familia FUR (*Ferric Uptake Regulator*) es el principal regulador transcripcional de genes involucrados en la homeostasis del hierro en la mayoría de bacterias (Hantke, 2001). Los homólogos Fur están ampliamente distribuidos en los genomas de cianobacterias como *Synechococcus* sp. PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Anabaena* sp. PCC7120, y *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Ghassemian & Straus, 1996, Bes et al., 2001, Hernandez et al., 2002, Kaneko et al., 1996, Martin-Luna et al., 2006). Fur actúa comúnmente

como represor y sensor de hierro. A altas concentraciones de hierro, Fur une  $\text{Fe}^{2+}$ , dimeriza y se une a los promotores de sus dianas a través de una secuencia consenso denominada Fur-box. Durante la deficiencia de hierro, el  $\text{Fe}^{2+}$  se libera de Fur, provocando un cambio conformacional en el regulador que produce su disociación del DNA, desreprimiendo la expresión de sus dianas (Bagg and Neilands 1987; Hernández et al. 2006).

### 1.3. La familia de metaloreguladores FUR

Las proteínas FUR constituyen una superfamilia de reguladores transcripcionales presentes en la mayoría de procariontes (Fillat, 2014). El primer miembro de la familia FUR caracterizado fue el parólogo Fur que dio nombre a la familia, que como se comentaba anteriormente, se describió como un represor transcripcional clásico que une  $\text{Fe}^{2+}$  como cofactor para regular la represión de sus dianas. Sin embargo, las proteínas de la familia FUR presentan una amplia diversidad en cuanto a su afinidad por diferentes metales, incluyendo sensores de hierro (Fur), zinc (Zur), manganeso (Mur), níquel, (Nur), sensores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (PerR) o de hemo (Irr) (Lee & Helmann, 2007) (Tabla 1).

**Tabla 1. Diferentes subclases de reguladores de la familia FUR y sus respectivas señales.**

Regulador	Señal	Descrito por primera vez
Fur ( <i>Ferric uptake regulator</i> )	$\text{Fe}^{2+}$	(Bagg & Neilands, 1987)
Zur ( <i>Zinc uptake regulator</i> )	$\text{Zn}^{2+}$	(Gaballa & Helmann, 1998)
Mur ( <i>Manganese uptake regulator</i> )	$\text{Mn}^{2+}$	Diaz-Mireles et al. (2004)
Nur ( <i>Nickel uptake regulator</i> )	$\text{Ni}^{2+}$	Ahn et al. (2006)
PerR ( <i>Peroxide response regulator</i> )	$\text{H}_2\text{O}_2$	Bsat et al. (1998)
Irr ( <i>Iron response regulator</i> )	Hemo	Hamza et al. (1998)

Además, estas proteínas están involucradas en el control de un amplio número de genes relacionados con el metabolismo general de la célula, el transporte de electrones y la defensa frente a diferentes estreses (Lee & Helmann, 2007). Aunque existen diferencias en su mecanismo de acción, las proteínas FUR presentan una serie de características comunes, como su bajo peso molecular (entre 13 y 20 kDa) y escaso contenido en residuos de triptófano. Las

proteínas FUR constan de un dominio N-terminal, con un motivo de unión a DNA y que tiene una estructura de hélice-giro-hélice y un dominio C terminal implicado en la dimerización. Su característica más reconocible es la presencia de un motivo rico en histidinas (HHXHXXCXXC), localizado al comienzo del extremo C-terminal, justo después de la región de separación entre los dos dominios. Además, algunos miembros de esta familia presentan un segundo motivo CXXC cercano al extremo C-terminal. Se ha propuesto que la forma activa de las proteínas FUR, la cual tiene capacidad de unión al DNA, corresponde con un homodímero. Cada uno de los monómeros a su vez consta de dos o incluso tres sitios de unión a metal pudiendo deducirse la función de los distintos sitios por su ubicación en la proteína y por el entorno de coordinación de metal. El denominado sitio 1, es el sitio de unión a metal estructural, llamado así porque es necesario para mantener una conformación adecuada. Se encuentra cercano al extremo C-terminal y el metal que lo ocupa suele estar coordinado por cuatro cisteínas dispuestas en dos motivos CXXC. El metal estructural suele ser Zn, aunque en varios homólogos Fur no se ha encontrado o no existe. El sitio 2 corresponde con el sitio de unión al metal regulador, aquel necesario para detectar la especie regulada por la proteína. Este sitio se encuentra en la región de separación entre el dominio de unión al DNA y de dimerización y suele implicar a residuos de ambos dominios para coordinar el metal. En cuanto al sitio 3, este no está presente en todas las proteínas Fur. Se encuentra en el dominio C terminal y se ha propuesto su implicación en la estabilización de dímero (Fillat, 2014).

#### **1.4. Reguladores FUR en *Anabaena* sp. PCC7120**

El análisis del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 en busca del motivo rico en histidinas (H2XHX2CX2C) característico de las proteínas FUR permitió encontrar tres parálogos que se denominaron *furA* (*all1691*), *furB* (*all2473*) y *furC* (*alr0957*) (Hernandez et al., 2004a). A continuación, se describen las características principales de las proteínas codificadas por estos genes.

##### **1.1.1. FurA**

El regulador FurA comparte la mayor similitud con las proteínas Fur de bacterias heterótrofas. Consta de 151 aminoácidos y presenta el motivo rico en histidinas característico de la familia y cinco residuos de cisteína, cuatro de ellos dispuestos en dos motivos CXXC y uno aislado. En *Anabaena* sp. PCC7120, FurA no solo ejerce un control transcripcional sobre procesos relacionados con la homeostasis del hierro, sino que actúa como un regulador global,

participando en la modulación de procesos como el estrés oxidativo, el metabolismo del nitrógeno o la fotosíntesis (Gonzalez et al., 2010, Gonzalez et al., 2016). También se ha descrito su unión a su propio promotor y a los de los promotores de *furB* y *furC*, requiriendo en todos los casos condiciones reductoras y la presencia de metal correpresor (Hernandez et al., 2004a, Hernández et al., 2006). Además, se ha demostrado que FurA está regulada a nivel postranscripcional por la acción del RNA antisentido *alr1690- $\alpha$ -furA* (Hernandez et al., 2006). Así mismo, FurA puede estar regulada también postraduccionalmente mediante su interacción con hemo, cuya unión provocaría la inactivación del regulador (Hernandez et al., 2004b), y por la interacción con 2-OG, que aumenta la actividad de unión de FurA por el promotor del regulador global del metabolismo del nitrógeno NtcA (Guio et al., 2020). Más recientemente se ha descrito otro mecanismo de regulación postranscripcional de FurA, mediante la interacción con la tiorredoxina TrxA la cual es capaz de cambiar el estado redox de FurA, reduciéndola (Guío et al., 2021).

### 1.1.2. FurB

FurB contiene 132 aminoácidos y presenta 5 residuos de cisteína, de los cuales, cuatro forman parte de dos motivos CXXC y uno está aislado. FurB ha sido descrito como el regulador Zur de *Anabaena* sp. PCC7120, dada su implicación en la homeostasis de zinc al controlar la transcripción de genes que regulan la incorporación y almacenamiento de este metal (Napolitano et al., 2012). Además, FurB también se ha relacionado con la regulación de la respuesta a estrés oxidativo pues regula la expresión de genes como superóxido dismutasa *sodA* o la peroxirredoxina *prxA* (Sein-Echaluze et al., 2015) y se ha descrito que puede unirse al DNA de forma inespecífica, protegiéndolo frente al estrés oxidativo (Lopez-Gomollon et al., 2009). Por otra parte, la sobreexpresión de FurB en *E. coli* y en *Anabaena* sp. PCC7120 incrementa la tolerancia al estrés oxidativo en ambas especies (López-Gomollón et al, BJ 2009 (Sein-Echaluze et al., 2015). Al igual que FurA, FurB es capaz de regular su propia expresión y las de los otros parálogos, requiriendo también condiciones reductoras y metal correpresor para la unión a sus promotores diana (Hernandez et al., 2004a)

### 1.1.3. FurC

De las tres proteínas FUR de *Anabaena* sp. PCC 7120, FurC es la que presenta menor similitud con las proteínas FUR caracterizadas hasta la fecha. FurC consta de 149 aminoácidos de los cuales tan sólo 3 son residuos de cisteína. A diferencia de FurA y FurB, en FurC ninguno de esos

residuos forma parte de un motivo CXXC (Figura 9). Además, el motivo de histidinas es considerablemente distinto del habitual en proteínas Fur (Figura 9).

MQQQAISTKPIRSLEDALER <b>C</b> QLLMRVSRQRFFILELLWQANEHLSAREIYDRLNQQGK	60
DIGHTSVYQNLEALSTQGIIESIER <b>C</b> DGRLYGNISDS <b>HSHVNC</b> LDTNQILDVHIQLPEAF	120
IQEVEQRTGVKITDYSINFYGYRHPQDEE	149

**Figura 9. Secuencia aminoacídica de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.** Se muestran en rojo los residuos de cisteína y en verde los residuos de histidina del motivo HXHXXCXT.

A diferencia de FurA y FurB, FurC no es capaz de unir hemo, lo cual está en concordancia con la ausencia de motivos CP o CPV en su secuencia (Lopez-Gomollon et al., 2009). Su nivel de expresión aumenta notablemente cuando las células son tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o metil viológeno, un agente generador de aniones superóxido (Yingping et al., 2014, Lopez-Gomollon et al., 2009).

La elevada inducción de la transcripción de este gen en presencia de peróxido junto con la inactivación de la proteína en ensayos de retardo en gel en presencia de hierro y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su capacidad de unión a los promotores de la peroxirredoxina *prxA* y la sulfirredoxina *srxA* llevaron a proponer que FurC era el regulador PerR de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Yingping et al., 2014). Por otro lado, FurC también parece estar relacionada con el metabolismo del nitrógeno dado que presenta en su promotor un sitio de unión de NtcA (Lopez-Gomollon et al., 2007). Además, trabajos previos de nuestro laboratorio y otros (Yingping et al., 2014), evidenciaron la imposibilidad de obtener un mutante de delección de *furC* de *Anabaena* sp. PCC7120, lo que sugería que *furC* podía ser un gen esencial para la cianobacteria. En esta tesis se ha estudiado el papel de FurC en el metabolismo global de *Anabaena* sp. PCC7120, así como los aspectos estructurales y bioquímicos que le definen como un regulador PerR. A continuación, se describen las principales características de las proteínas PerR.

## 1.2. Proteínas PerR (*Peroxide response Regulator*)

Como se ha comentado, PerR integra la respuesta a estrés oxidativo con la disponibilidad de metal (Fe<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>) (Sevilla et al., 2021). Se han encontrado ortólogos PerR en bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Bsat et al., 1998), *Listeria monocytogenes* (Rea et al., 2005), *Staphylococcus aureus* (Morikawa et al., 2006), *Clostridium acetobutylicum* (Hillmann et al., 2008) y *Streptococcus pyogenes* (King et al., 2000). En bacterias Gram-negativas, como regulador global de la respuesta al peróxido suele actuar OxyR en lugar de PerR.

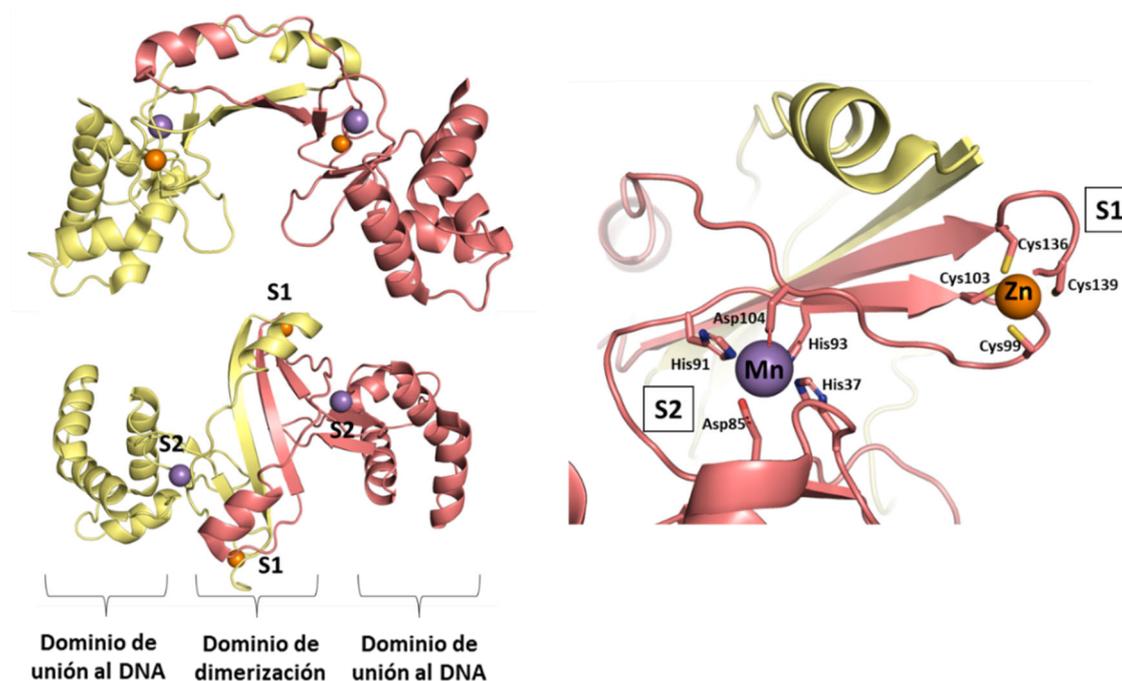
Sin embargo, varias especies contienen tanto OxyR como PerR (Mongkolsuk & Helmann, 2002, Dubbs & Mongkolsuk, 2012), como la bacteria Gram-positiva *Streptomyces coelicolor* y la bacteria Gram-negativa *Neisseria gonorrhoeae* (Hahn et al., 2000, Kim et al., 2021, Wu et al., 2006b, Tseng et al., 2003). Finalmente, existen algunas bacterias Gram-negativas que tienen únicamente PerR, como *Campylobacter jejuni* (Van Vliet et al., 1999) y *Leptospira interrogans* (Lo et al., 2010). Como se ha mencionado, también se han descrito ortólogos de PerR en cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Anabaena* sp. PCC7120 (Yingping et al., 2014, Sarasa-Buisan et al., 2021, Li et al., 2004). El regulador PerR de *B. subtilis* fue el primer regulador PerR identificado y hasta la fecha es el ortólogo mejor caracterizado (Bsat et al., 1998).

PerR de *B. subtilis* es una metaloproteína de 144 aminoácidos que contiene un átomo de zinc estructural y un sitio de unión a metal regulador que puede estar ocupado por hierro o manganeso. La incorporación de un metal u otro regula su capacidad de respuesta al estrés oxidativo. De este modo, la forma PerR:Zn,Fe es sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y es capaz de sufrir oxidación catalizada por metal conducida por el hierro, mientras que la forma PerR:Zn,Mn es relativamente insensible (Lee & Helmann, 2006b, Herbig & Helmann, 2001). Las características estructurales, así como el mecanismo de regulación y una visión general del regulón de diferentes proteínas PerR se describen a continuación.

### 1.2.1. Características estructurales de proteínas PerR

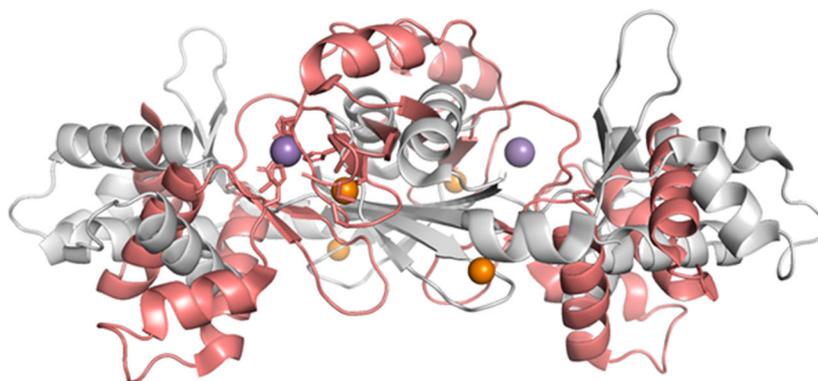
La primera estructura cristalográfica disponible de una proteína PerR correspondía con la forma apo de PerR de *B. subtilis* (PerR:Zn) (Lee & Helmann, 2006a). Posteriormente se resolvieron las estructuras de la forma activa PerR:Zn,Mn (Traore et al., 2006) y la forma oxidada 2-oxoPerR:Zn (Traore et al., 2009). Al igual que otros miembros de la familia Fur, PerR posee un dominio N-terminal de unión al DNA (residuos 2-85) y uno C-terminal de dimerización (residuos 92-144). El dominio de unión al DNA contiene 4 hélices alfa seguidas de dos láminas beta antiparalelas, mientras que el dominio de dimerización el cual contiene el sitio de unión a zinc estructural consta de tres láminas beta antiparalelas y dos hélices alfa (Figura 10.A).

El sitio de unión a zinc (S1) consiste en dos motivos CXXC formados por las cisteínas Cys96, Cys99, Cys134 y Cys139 y se relaciona con la dimerización de la proteína (Figura 10.B). Por otro lado, además del metal estructural, PerR puede unir en su sitio regulador Fe<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>. Los residuos implicados en la coordinación del metal regulador en PerR de *B. subtilis* son His37, Asp85, His91, His93 y Asp104 (Jacquamet et al., 2009) (Figura 10.B).



**Figura 10. Estructura cristalográfica de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis*.** En el panel derecho se muestra la estructura general y los diferentes dominios y ubicación de los sitios de unión a metal. En el panel derecho se muestran los aminoácidos implicados en el sitio de unión a metal estructural (S1) y a metal regulador (S2) de PerR:Zn,Mn (Jacquamet et al., 2009). Visualización y edición realizada con PyMOL (v 2.0 Schrödinger, LLC).

Estos residuos están conservados en la mayoría de PerR cristalizadas hasta la fecha (Figura 20). Además, como se observa en la Figura 11, la incorporación del metal regulador provoca un cambio conformacional desde la forma “abierta” PerR:Zn a la forma “cerrada” PerR:Zn,Mn permitiendo así la unión de PerR al DNA (Traoré et al., 2009). Cuando la proteína PerR en su forma activa “cerrada” es oxidada en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ , ésta adquiere de nuevo la forma “abierta” similar a la forma apo, que es inactiva e incapaz de unirse al DNA (Figura 11).



**Figura 11. Solapamiento de las estructuras cristalográficas de PerR:Zn,Mn (PDB: 3F8N) (rosa) y PerR:Zn (PDB: 2RGV) (gris) de *B. subtilis*.** Visualización y edición realizada con PyMOL (v 2.0 Schrödinger, LLC).

Por otro lado, el residuo Asp104 se ha considerado como residuo clave para la sensibilidad de la proteína al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , puesto que su mutación por un glutamato resulta en la insensibilidad frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De hecho, en *B. subtilis* se observó que el remplazamiento del Glu108 en Fur por aspártico, convertía a Fur en una proteína sensible al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Caux-Thang et al., 2015).

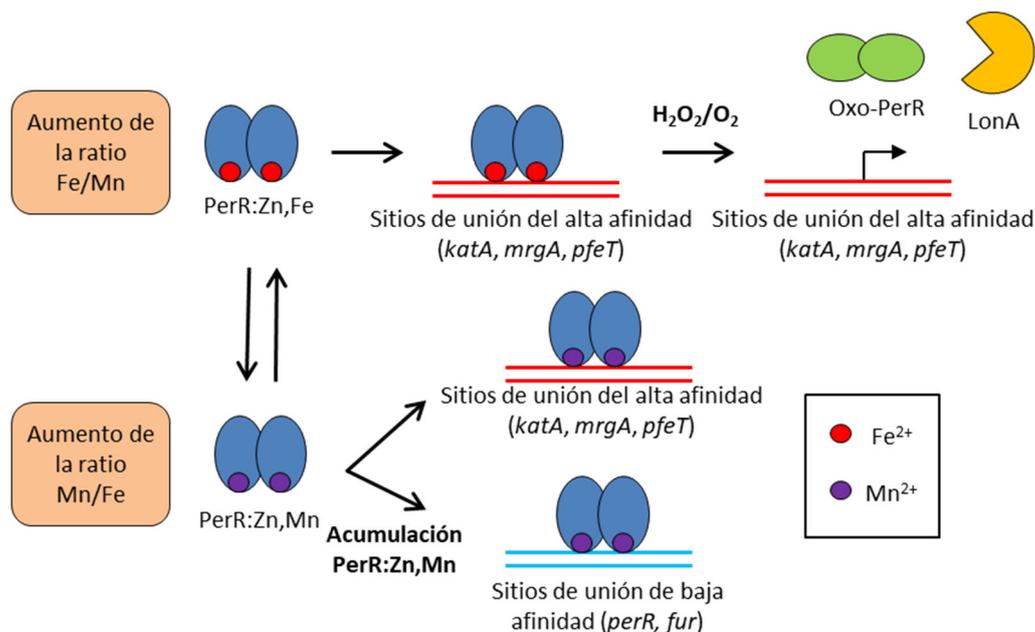
### 1.2.2. Mecanismo de regulación de PerR: oxidación catalizada por metal (MCO)

El mecanismo de regulación de las proteínas PerR se basa en la detección de la ratio  $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  en la célula y su integración con las condiciones redox impuestas por los niveles de oxígeno o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sevilla et al., 2021). En *B. subtilis*, PerR percibe la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular mediante una oxidación catalizada por metal (MCO) (Lee and Helmann, 2006). En esta reacción, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$  unido en el sitio regulador oxidando en última instancia la proteína en la histidina 37 (His37) o en la histidina 91 (His91) que incorporarían un átomo de oxígeno. La oxidación de uno de estos dos residuos sería responsable de la pérdida de afinidad por el metal regulador causando la incapacidad de PerR de unirse al DNA (Lee & Helmann, 2006b). Además de a través del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ha descrito que PerR de *B. subtilis* podría sufrir MCO directamente por la presencia de  $\text{O}_2$  (Sethu et al., 2016).

En la Figura 12 se muestra un esquema del mecanismo de regulación de PerR de *B. subtilis* sobre sus promotores diana en respuesta a la disponibilidad de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  y la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2$ . Cuando la ratio  $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  aumenta en la célula, PerR:Zn une  $\text{Fe}^{2+}$ , reprimiendo su regulón. En presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o en condiciones aeróbicas la proteína PerR:Zn,Fe se oxida irreversiblemente mediante MCO y se libera de sus promotores dando lugar a la expresión de sus genes diana. A continuación, la proteína oxidada en su forma oxo se degrada por la proteasa LonA, como mecanismo para prevenir la acumulación de la proteína PerR inactiva (Ahn & Baker, 2016) (Figura 12). Por otro lado, cuando la concentración de  $\text{Mn}^{2+}$  aumenta o la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  disminuye en la célula, PerR:Zn une  $\text{Mn}^{2+}$  (PerR:Zn,Mn) y se une a sus promotores diana reprimiendo su transcripción de una forma insensible a la MCO. Cabe destacar que las formas PerR:Zn,Fe y PerR:Zn,Mn pueden regular diferentes grupos de genes. Aunque las bases moleculares para este comportamiento aún se desconocen, se han propuesto dos posibilidades (Pinochet-Barros & Helmann, 2018):

- Que la forma PerR:Zn,Fe y la forma PerR:Zn,Mn puedan tener diferentes conformaciones que afectan a su unión al DNA.

- Que en presencia de  $H_2O_2$  o de  $O_2$  la forma con  $Mn^{2+}$ , PerR:Zn,Mn, se acumule por ser una forma insensible a la MCO permitiendo la represión de todo el regulón de PerR incluidos los sitios por los que PerR tiene menor afinidad, como los promotores de los genes *fur* o *perR*. Sin embargo, en el caso de la forma PerR:Zn,Fe, ésta sería mucho más sensible a la oxidación por MCO, y no se acumularía, pudiendo llegar a reprimir únicamente a los genes por los que presenta una mayor afinidad (Figura 12).



**Figura 12. Modelo propuesto para el mecanismo de acción de regulación transcripcional de PerR de *B. subtilis*.** En una situación de aumento de la ratio  $Fe^{2+}/Mn^{2+}$  en la célula, en condiciones aeróbicas se produce la oxidación irreversible de PerR mediante oxidación catalizada por metal (MCO) que evita la acumulación del represor activo en estas condiciones. Este comportamiento facilita la represión de los genes por lo que PerR tiene alta afinidad (líneas rojas). Sin embargo, cuando la ratio  $Mn^{2+}/Fe^{2+}$  aumenta, aumenta la forma PerR:Zn,Mn que además es insensible a la oxidación, por lo que se acumula permitiendo la represión de los genes de baja afinidad (líneas azules). Adaptado de (Sevilla et al., 2021)

### 1.2.3. El regulón de PerR

PerR normalmente actúa como represor de la transcripción de genes que participan en la respuesta al estrés oxidativo y la homeostasis de metales. El regulón de PerR de *B. subtilis* comprende en primer lugar genes que están involucrados en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno. Dentro de este grupo podemos encontrar a la catalasa *kataA* y a la alkyl hidropoxidasa *ahpC* (Chen et al., 1995) (Bsat et al., 1998), que participan directamente en la detoxificación del  $H_2O_2$ . Un segundo grupo incluye genes relacionados con la homeostasis de metales como *hemAXCDBL* (síntesis de hemo) (Faulkner et al., 2012), *mrgA* (miniferritina tipo Dps implicada en la captura/almacenamiento de hierro) (Chen & Helmann, 1995, Chiancone & Ceci, 2010), *pfeT*, una ATPasa involucrada en el transporte de  $Fe^{2+}$  (Guan et al., 2015) y *zosa*,

una ATPasa implicada en el transporte de  $Zn^{2+}$  (Gaballa & Helmann, 2002) . Por otro lado, y con menos afinidad, PerR controla la expresión de Fur y su propia expresión (Fuangthong et al., 2002). El regulón de PerR también se ha identificado en otras bacterias heterótrofas como *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. coelicolor*, *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *N. gonorrhoeae* (Ricci et al., 2002, Horsburgh et al., 2001a, Rea et al., 2004, Brenot et al., 2005, Hahn et al., 2000, Kim et al., 2021, Palyada et al., 2009, Wu et al., 2006). En el caso de patógenos como *S. pyogenes*, *S. aureus* o *L. Monocytogenes*, el regulón de PerR está compuesto principalmente por genes implicados en la defensa contra el estrés oxidativo y el metabolismo de hierro frecuentemente vinculado a la patogénesis (Horsburgh et al., 2001b, Horsburgh et al., 2001a, Rea et al., 2005, Brenot et al., 2005). En el caso concreto de *S. aureus*, PerR también incluye en su regulón otros genes como *ftn* y *bcp* que codifican una proteína de almacenamiento de hierro y una bacteroferritina respectivamente y la tiorredoxina reductasa *trxB*. En el caso de *N. gonorrhoeae*, el regulón de PerR no incluye a *kata* (Tseng et al., 2003), sin embargo, regula la expresión del operón *mntABC*, que codifica un transportador de  $Mn^{2+}$  de tipo ABC (Wu et al., 2006). En cianobacterias, hasta el momento únicamente se ha identificado el potencial regulón de PerR de *Synechocystis* sp. PCC6803, el cual comprende genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo como *ahpC* (hidroperóxido de alquilo reductasa) o *sodB* (superóxido dismutasa) y también involucrados en la homeostasis del hierro como *idiA*, *isiA* (proteína de unión a clorofila inducida en estrés por hierro) o *mrgA*. (Li et al., 2004).

Además de la función canónica de PerR como represor transcripcional se ha descrito que PerR también puede funcionar como activador transcripcional, como es el caso de la regulación de *srfA* por PerR de *B. subtilis* (Hayashi et al., 2005) o *csp* por PerR de *S. pyogenes* (Brenot et al., 2005), aunque en estos casos el mecanismo transcripcional subyacente aún se desconoce. No obstante, ensayos de *footprinting* de PerR sobre los promotores de *srfA* y *csp* mostraron que la activación se realiza mediante la interacción de PerR con cajas PerR que se encuentran en la región distal de estos promotores y alejadas del inicio de transcripción. En cambio, en los casos en los que PerR funciona como represor, el regulador se une a cajas PerR que se sitúan cerca del inicio de transcripción.

En este trabajo se ha abordado la caracterización funcional de FurC en *Anabaena* sp. PCC7120, el cual fue inicialmente descrito como el regulador PerR de esta cianobacteria (Yingping et al., 2014). Sin embargo, al inicio de esta Tesis, la información referente a esta proteína era escasa. Aunque en nuestro laboratorio se había realizado la purificación de FurC (Hernandez et al., 2004a), no se obtuvieron evidencias de su capacidad de unión a DNA. Por otra

parte, como ya se ha mencionado anteriormente, la imposibilidad de obtener un mutante de delección de FurC en *Anabaena* sp. PCC7120 sugería que este regulador es esencial para la cianobacteria. Por lo tanto, para llevar a cabo los objetivos de esta Tesis, se trabajó con una estirpe de sobreexpresión de *furC* que nos ha permitido avanzar considerablemente en la caracterización funcional de este regulador.

# Objetivos



## 2. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la función biológica del regulador transcripcional FurC (PerR) en *Anabaena* sp. PCC7120, incluyendo la caracterización bioquímica de este regulador. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Sobreexpresión y puesta a punto de la purificación de FurC recombinante en *E. coli* con un nivel óptimo de actividad y pureza para su uso en la caracterización bioquímica y funcional.
2. Estudio de las características bioquímicas y estructurales de FurC.
3. Caracterización fenotípica de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC).
4. Evaluación del papel de FurC en el metabolismo del nitrógeno.
5. Identificación del consenso de unión a DNA de FurC y búsqueda *in silico* de nuevos sitios de unión de FurC en las regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp PCC7120. Identificación de nuevas dianas.
6. Estudio del efecto de la sobreexpresión de *furC* en la composición del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120.

# Materiales y métodos



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Organismos y condiciones de cultivo

##### 3.1.1. *Escherichia coli*

Las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo y las características más relevantes de su genotipo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *E. coli*.

Cepa	Características	Empleo	Procedencia
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -	Conservación de plásmidos	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>omp T, hsd SB</i> (rB-, mB-), <i>gal, dcm</i>	Expresión de proteínas	Invitrogen
DH5 $\alpha$ pET <i>furC</i>	DH5 $\alpha$ conteniendo el plásmido pET28a:: <i>furC</i>	Conservación del plásmido	Este trabajo
BL21 (DE3) pET <i>furC</i>	BL21(DE3) conteniendo el plásmido pET28a:: <i>furC</i>	Sobreexpresión de FurC	Este trabajo

##### 3.1.1.1. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se cultivaban en medio rico Luria-Bertani (LB): 10 g/L cloruro sódico, 10 g/L triptona; 5 g/L extracto de levadura a 37 °C con agitación mecánica constante de 180-250 rpm. Para la preparación de medio sólido se añadió agar a una concentración final de 1,5 % (p/v). El medio se esterilizaba en autoclave. Cuando fue necesario, los cultivos se suplementaron con 50  $\mu$ g/mL kanamicina (Km) esterilizada por filtración.

##### 3.1.2. *Anabaena* sp. PCC7120

En este trabajo se utilizó como material biológico de estudio la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC7120 (= *Nostoc* sp. PCC7120). Además, se utilizó una estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) derivada de *Anabaena* sp. PCC 720, cuyo genotipo y procedencia se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Procedencia / Descripción
PCC7120 (WT)	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120. Estirpe silvestre	IBVF, Sevilla, España
EB2770FurC (EB)	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 conteniendo pAM2770:: <i>furC</i> ; sobreexpresa <i>furC</i>	(Sevilla et al. 2019)

### 3.1.2.1. Medios y condiciones de cultivo

*Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC se cultivaron fotoautotróficamente en condiciones axénicas en medio BG11 (Rippka, 1979), que se preparó añadiendo a 1 litro de medio basal (Tabla 4) un mililitro de suplemento (Tabla 5). La disolución resultante fue autoclavada. Para los cultivos en deficiencia de nitrógeno se eliminó el NaNO<sub>3</sub> del medio basal que constituía la fuente de nitrógeno (denominándose entonces como medio BG11<sub>0</sub>).

Tabla 4. Medio basal BG11 1X (3 litros)

Reactivo	Gramos	Concentración final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	4,05	16
NaHCO <sub>3</sub>	2,214	8,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,12	0,2
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,108	0,25
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,225	0,3
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,06	0,2

Tabla 5. Suplemento BG11 1000X (100 mL)

Reactivo	Miligramos	Concentración final (μM) en medio completo
Citrato férrico amónico	600	30
Ácido cítrico	600	30
EDTA	100	190
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	286	46
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	181	9,15
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	13.8	0,77
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	39	1,61
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	7,9	0,32
CoCl <sub>2</sub>	4,94	0,17

Para los cultivos de la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC, se requirió la adición de 50 μg/mL de neomicina, la cual se esterilizó mediante filtración.

Los cultivos en medio líquido se cultivaron a 28 °C con un régimen constante de luz blanca entre 25-30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mediante agitación orbital continua a 120 rpm en un incubador orbital Innova 43 R a. Para comenzar precultivos desde colonia, se utilizaron matraces de 100 mL de capacidad, conteniendo entre 20-40 mL de cultivo.

Para la mayoría de los experimentos se utilizaron Erlenmeyer de 200 mL de capacidad conteniendo entre 80-100 mL de cultivo. En los casos en los que se necesitaba alcanzar un mayor volumen de cultivo se utilizó la agitación por burbujeo constante con aire estéril en frascos Roux de 900 mL (conteniendo entre 300-800 mL de cultivo). Para los cultivos en medio sólido se adicionó agar noble (Difco) sobre el medio BG11 líquido hasta una concentración final del 1 % (p/v) y se autoclavó la mezcla resultante. Los cultivos en placas de Petri se incubaron a 28 °C con iluminación lateral con luz blanca (10-20  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Las condiciones “estándar” de cultivo se definieron como cultivo en medio BG11 a 28 °C con un régimen constante de luz blanca entre 25-30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

### **3.1.2.2. Experimentos de inducción de estreses abióticos**

Para los experimentos control en condiciones estándar se partió de precultivos frescos de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe EB2770FurC en medio BG11 crecidos hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento. Estos precultivos se diluían posteriormente hasta una D.O. a 750 nm de 0,15 o 0,4 y en un volumen final de 80 o 100 mL dependiendo del experimento. El procedimiento para la inducción de cada estrés abiótico se detalla en los siguientes apartados.

#### **3.1.2.2.1. Inducción de estrés oxidativo**

A partir de cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía de crecimiento, se comenzaba el experimento con 100 mL de cultivo ajustados a una D.O. a 750 nm de 0,4. Para inducir la condición de estrés oxidativo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A partir de la preparación comercial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del 33 % (p/v) (9,7 M) (Sigma) se tomó la cantidad apropiada para conseguir una concentración final en el cultivo de 250  $\mu\text{M}$ .

#### **3.1.2.2.2. Inducción de la deficiencia de nitrógeno**

Se partió de cultivos crecidos en BG11 hasta fase exponencial tardía de crecimiento de los cuales se recogió en tubos Falcon estériles aproximadamente el volumen necesario de cultivo para ajustar 100 mL de volumen final a una D.O. a 750 nm de 0,4. Estos Falcon se centrifugaron 5 min a 3080 x g y temperatura ambiente para retirar el medio del cultivo, y se lavaron 3 veces

en esterilidad con el mismo volumen de medio fresco deficiente en nitrógeno combinado (BG11<sub>0</sub>). Finalmente, se resuspendieron las células en medio BG11<sub>0</sub> hasta un volumen final de 100 mL. Para asegurar que la deficiencia de nitrógeno se había alcanzado, se realizaron seguimientos de la diferenciación de heterocistos mediante microscopía de campo claro (apartado 3.14.1) durante las siguientes 24, 48, 72 y 96 h.

## **3.2. Métodos de aislamiento y análisis del DNA**

### **3.2.1. Aislamiento del DNA**

#### **3.2.1.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala (miniprep) y cuantificación del DNA**

La extracción de DNA plasmídico conservado en cepas de *E. coli* se realizó con el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogen mediante centrifugación a velocidad máxima de 1 a 5 mL de células cultivadas O/N a 37 °C y 180 rpm. El precipitado se resuspende en el tampón proporcionado y se rompen las células mediante lisis alcalina con SDS. Posteriormente la mezcla se neutraliza y se centrifuga a velocidad máxima para eliminar restos celulares. El DNA que ha quedado en la fracción soluble se adsorbe sobre una columna de sílice y posteriormente se eliminan las impurezas mediante un lavado con una solución que contiene etanol. Finalmente, se eluye el DNA de la columna con agua MQ (Milli-Q). La determinación de la concentración del plásmido extraído se llevó a cabo con un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

#### **3.2.1.2. Extracción de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC7120**

El DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC7120 que se requirió a lo largo de este trabajo para la amplificación de diversos promotores se extrajo mediante el siguiente protocolo adaptado del método descrito por Cai y Wolk (1990):

1. Se centrifugan 25-50 mL de cultivo en fase exponencial a 3080 x *g* y temperatura ambiente durante 5 min.
2. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en el volumen restante para repartirse en dos tubos Eppendorf de 2 mL con tapón de seguridad.
3. Se centrifugaron los tubos Eppendorf a 16500 x *g* y 4 °C durante 5 min y se descartó por completo el sobrenadante.

4. El precipitado de células se resuspende en 400  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM.
5. Se añaden 20  $\mu\text{L}$  de 10 % SDS, 450  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1) y 3 puntas de espátula de perlas de vidrio y se realizan cuatro ciclos de 1 min de agitación en vórtex - 1 min de reposo en hielo. (con este paso se consigue la rotura de las células).
6. El lisado se centrifuga durante 15 min, 16500 x  $g$  y 4 °C y la fase superior acuosa se transfiere a tubos Eppendorf nuevos.
7. La fase superior acuosa se extrae con 1 vol. de fenol, 1 vol. de fenol-cloroformo (1:1) y 2 veces con 1 vol. de cloroformo hasta conseguir una fase acuosa completamente incolora. En todos los lavados se descarta la fase orgánica inferior.
8. Se añade a la fase acuosa 1 vol. de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 vol. de etanol absoluto frío y se incuba durante 1 h a - 80 °C para conseguir la precipitación del DNA.
9. Se centrifuga durante 15 min a 4 °C y velocidad máxima.
10. El DNA obtenido se lava con etanol al 70 % preenfriado, se seca al aire y se resuspende en 50-100  $\mu\text{L}$  de agua MQ estéril.
11. El DNA obtenido se cuantifica con un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

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

Los ensayos de PCR convencional se realizaron en un termociclador Thermo Cycler 2720 (Applied Biosystems) en un volumen final de 50-100  $\mu\text{L}$ . Para la amplificación se utilizó la enzima *Taq* polimerasa (BioTools) y las mezclas de reacción se prepararon utilizando los reactivos en los rangos de concentraciones indicadas por el fabricante (Tabla 6). Como DNA molde se utilizó DNA genómico aislado de *Anabaena* sp. PCC7120 (apartado 3.2.1.2).

**Tabla 6. Mezcla reacción para reacción de PCR con *Taq* polimerasa.**

Reactivo	Microlitros
Agua MQ	38,1
Tampón 10X	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTPs 10 mM	2
Primer up 20 $\mu\text{M}$	1,25
Primer down 20 $\mu\text{M}$	1,25
Taq	0,5
DNA molde dil 1/10	10-40 ng (1 $\mu\text{l}$ )
VOLUMEN TOTAL	50

Las reacciones siguieron el siguiente programa de PCR estándar:

1. Desnaturalización inicial: 95 °C, 5 min
  2. Desnaturalización: 95 °C, 30 s
  3. Hibridación:  $T_m$  (-4), 30 s
  4. Elongación: 72 °C, 1 min/kb
  5. Elongación final: 72 °C, 10 min
  6. Conservación: 4 °C, ∞
- } 30 ciclos

La temperatura de la etapa de hibridación se modificó en cada caso, siendo siempre unos 4 °C inferior a la  $T_m$  obtenida para los oligonucleótidos y nunca inferior a los 45 °C, para evitar la aparición de amplificaciones inespecíficas. Todos los oligonucleótidos empleados (Tabla suplementaria S1) se adquirieron a Invitrogen o Biomers.

La correcta amplificación y ausencia de productos inespecíficos de PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa como se describe en el apartado 3.2.3. Los productos de PCR correspondientes a las regiones promotoras se purificaron mediante el uso de columnas comerciales con matriz de fibra de vidrio del Kit "Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta etapa se realizó con el objetivo de eliminar los reactivos sobrantes de la PCR, que podrían interferir en posteriores ensayos. La cuantificación de los productos de PCR se realizó utilizando un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

### 3.2.3. Electroforesis de DNA

La correcta amplificación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM pH 8). Para la preparación de los geles, se calentaron en un horno microondas 0,5 g de agarosa en 50 mL de tampón TBE hasta conseguir su disolución. Tras atemperar la mezcla unos minutos, pero antes de su solidificación, se añadió en campana extractora bromuro de etidio (3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) a una concentración final de 0,5 µg/mL para la detección del DNA.

Las muestras de DNA se prepararon en presencia del tampón de carga 6x Loading Solution (Fermentas), cuya composición es Tris-HCl 10 mM pH 7,6, azul de bromofenol 0,03 %, xilenocianol FF 0,03 %, EDTA 60 mM y glicerol 60 %. Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleó como patrón el marcador TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad) con tampón TBE 1x, aplicando un voltaje de 90 V durante 30-45 min con una fuente de corriente PowerPac300 (Bio-Rad). Los resultados se visualizaron y registraron con un equipo GelDoc 2000 (Bio-Rad), que disponía de una lámpara de luz UV con  $\lambda=302$  nm.

### **3.3. Métodos de aislamiento y análisis del RNA**

Durante el aislamiento y análisis del RNA, es necesario seguir una serie de medidas de precaución para evitar la degradación de este por la actividad de ribonucleasas (RNAsas). Las RNAsas son enzimas muy estables y ubicuas, cuyo origen puede ser endógeno (del organismo fuente del RNA, tras la lisis celular) o exógeno (por agentes contaminantes procedentes del ambiente o del propio investigador, ya que son secretadas por la piel) (Harder & Schröder, 2002) Por este motivo fue de vital importancia tomar las siguientes precauciones:

Fue necesario trabajar con guantes y renovarlos con frecuencia, además de evitar hablar en la cercanía de las muestras. Asimismo, se procuró trabajar con la mayor rapidez posible, tanto en el proceso de recogida de muestra para evitar cambios indeseados en la población del RNA mensajero como en el proceso de extracción del RNA, ya que este puede ser degradado por las nucleasas endógenas de la cianobacteria durante el proceso de lisis celular.

Asimismo, se tomaron precauciones con el lugar y material de trabajo. La campana extractora o poyata de trabajo, las micropipetas y las espátulas se lavaron previamente con NaOH 0,4 M y se secaron con papel. El material de plástico que se utilizó como tubos Falcon o Eppendorf era libre de RNAsas, estéril y desechable.

Por último, todas las disoluciones se prepararon en botellas previamente autoclavadas y con reactivos libres de RNAsas y agua MQ previamente autoclavada. Además, se autoclavaron todas las disoluciones tras su preparación. Todas las disoluciones se preparaban poco tiempo antes de su uso para evitar contaminaciones.

### 3.3.1. Toma de muestra de cultivos de cianobacterias para la extracción de RNA

Para la recogida de los cultivos para la posterior extracción del RNA, se trabajó con la mayor brevedad posible para evitar cambios en la población del RNA mensajero. El procedimiento utilizado se describe a continuación.

- Se centrifugan 25 mL de cultivo, 5 min, 3080 °C y se elimina el sobrenadante.
- Se resuspenden las células en el volumen restante y se transfieren a un Eppendorf de 2 mL libre de RNasas. Se centrifuga 5 min, 16500 x *g*, 4 °C
- Se elimina en totalidad el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 600 µl de Tampón de recogida y 130 µl de cloroformo
- Se invierten los tubos 4 veces y se deja reposar 3 min en hielo.
- Se centrifugan los tubos 5 min a 16500 x *g*, 4 °C
- Se obtienen 3 fases: Se aísla la fase intermedia, eliminando la fase superior acuosa, y eliminando la fase inferior orgánica (cloroformo).
- Se congelan las muestras sumergiéndolas en nitrógeno líquido y se guardan a -80 °C hasta su próximo uso.

### 3.3.2. Extracción del RNA

A partir de las muestras anteriores, se extrae el RNA mediante el siguiente procedimiento:

1. A la muestra de células congelada se añaden rápidamente 300 µl de tampón de resuspensión (sacarosa 0,3 M, acetato de sodio 10 mM pH 4,5), 100 µl de EDTA disódico 250 mM pH 8, 400 µl de tampón de lisis (SDS 2 % (p/v)), acetato de sodio 10 mM pH 4,5) y 990 µl de fenol ácido a 65 °C (Sigma).
2. Se realizan 3 ciclos de agitación en vórtex durante 30 s seguida de incubación a 65 °C durante 2'30'' en baño termostático.
3. Se centrifugan las muestras 5 min a 16500 x *g* y 4 °C y se transfiere la fase acuosa (superior) a un Eppendorf de 2 mL nuevo.
4. Se añade 1 mL de Trizol® (Invitrogen), se agita en vórtex durante 30 s y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Se añaden 200 µL de cloroformo, se agita en vórtex durante 30 s y se deja reposar a temperatura ambiente durante 1 min.
6. Se centrifugan los tubos 5 min a 16500 x *g* y 4 °C y se transfieren 750 µL de fase acuosa a un tubo Eppendorf de 2 mL nuevo.

7. Se añade 1 vol. de cloroformo y se agita en vórtex durante 30 s. Se centrifuga 5 min a 16500 x *g* y 4 °C y se transfieren 600 µL de la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 2 mL nuevo.
8. Se añade 1 vol. de cloroformo y se agita en vórtex durante 30 s. Se centrifugan los tubos 5 min a 16500 x *g* y 4 °C y se transfieren 400 µL de la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo de 2 mL (es importante no apurar para no llevarse parte de la fase orgánica que puede interferir en próximos experimentos).
9. Se añaden 2 vol. de etanol absoluto preenfriado y se agita en vortex 30 s
10. Se dejan las muestras precipitar O/N a -80 °C

### **3.3.3. Tratamiento con DNasa I y comprobación de la integridad del RNA**

Las muestras de RNA guardadas a -80 °C para su precipitación, se centrifugaron 30 min a 16500 x *g* y 4 °C, y se descartó el sobrenadante con cuidado de no alterar el precipitado. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 70 % preenfriado y se centrifugaron los tubos durante 5 min a 16500 x *g* y 4 °C. Finalmente, se descartó el sobrenadante en la medida de lo posible y se dejaron secar los tubos abiertos a temperatura ambiente durante máximo 45 min para evaporar todo el etanol. Una vez evaporado, se añadieron 90 µL de agua libre de RNasas (Ambion) y se dejó hidratar el precipitado de RNA durante 15 min. A continuación, se resuspendió mediante pipeteo y se transfirió la muestra a un tubo de PCR para comenzar el tratamiento con DNasa I. En este tubo, se añadieron 10 µL de tampón de DNasa I y 2 µL de DNasa I libre de RNasas (Roche) y se incubó la reacción en un termociclador 70 min a 37 °C + 10 min a 65 °C. Una vez finalizada, a cada tubo se añadieron de nuevo 2 µL de DNasa I adicionales y se repitió el mismo programa en el termociclador.

Tras el tratamiento se verificó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado 3.2.3). En este caso se cargaron siempre 2 µL de la muestra de RNA en un gel de agarosa al 1 % en TBE dispuesto de 15 pocillos para su correcta visualización.

### **3.3.4. Cuantificación de RNA**

La concentración del RNA aislado se determinó mediante espectrofotometría, empleando un espectrofotómetro SPECORD® PLUS. Para realizar la cuantificación se usaron cubetas de cuarzo lavadas previamente con NaOH 0,4 M y aclaradas 2 veces con agua MQ autoclavada. La línea base se realizó con agua libre de RNasas utilizando un espectro entre 200-600 nm. Las muestras se diluyeron 1/40 para su cuantificación añadiendo a la cubeta 390 µL de agua libre de RNasas

y 10 µL de RNA mezclando por inversión 4 veces con la ayuda de parafilm. Una vez realizado el espectro, se registró la absorbancia a 260 nm (RNA) y 280 nm (proteínas) y se comprobó cualquier contaminación de las muestras a 600 nm (turbidez). La concentración y la pureza del RNA se calculó siguiendo la siguiente fórmula.

$$* 1 \text{ U A260 (ssRNA)} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$* \text{Ratio A260/A280 (pureza)} = 1,8-2$$

### 3.3.5. Comprobación de la ausencia de DNA en las muestras de RNA aislado.

A pesar del tratamiento con DNasa I, era posible que en algunos casos siguiese existiendo contaminación con DNA endógeno, por lo que antes de la retrotranscripción se determinó la ausencia de este mediante PCR a tiempo real. Para la reacción se realizó una dilución del RNA para simular la misma concentración de RNA retrotranscrito que será utilizada para las PCR a tiempo real de cada gen a analizar (1 ng/µL), y así poder determinar si existe contaminación de DNA detectable a esa concentración que pudiera afectar a las posteriores determinaciones. Para ello se estimó que la concentración media de las muestras de RNA aislado era 200 ng/µL, de modo que se tomaron 2,5 µL de RNA y se mezclaron con 500 µL de agua libre de RNasas. La reacción de PCR a tiempo real se preparó como se indica en el apartado 3.3.7, utilizando el gen de referencia *rnpB* y se llevó a cabo utilizando un equipo Viia™ 7 Real-Time PCR System o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System de Applied Biosystem. En los casos en los que se detectó amplificación del DNA por debajo del ciclo 30 de la PCR, se realizó un nuevo tratamiento con DNasa I, añadiendo únicamente 2 µL de enzima DNasa I y corriendo el programa del termociclador para el tratamiento de DNasa descrito en el apartado 3.3.3.

### 3.3.6. Retrotranscripción

El RNA aislado y purificado se retrotranscribió para obtener cDNA empleando la enzima SuperScript Reverse Transcriptase® de Invitrogen. En un tubo de PCR se añadieron 2 µg de RNA, 1 µL de solución de cebadores redundantes "*Random primers*" (Sigma) (300 ng/µL), 2 µL de tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, KCl 150 mM) y se completó el volumen de cada tubo hasta 20 µL con agua libre de RNasas. En un termociclador, las muestras se incubaron 10 min a 85 °C para su desnaturalización seguidos de 60 min a 50 °C para la hibridación de los "*random primers*". Durante esta incubación se preparó una mezcla de reacción que contenía por tubo, 2 µL de dNTPs 10 mM, 4 µL de DTT 0,1 M, 8 µL de tampón de

retrotranscripción 5x (Invitrogen) y 5  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas. Inmediatamente, tras finalizar la primera incubación de las muestras, a cada tubo por separado se añadieron 19  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima SuperScript Reverse Transcriptase<sup>®</sup> 200. Los tubos se incubaron en un termociclador durante 60 min a 47 °C para que se produjera la extensión de los cebadores redundantes seguidos de 15 min a 75 °C para detener la reacción. El cDNA retrotranscrito se guardó a -20 °C hasta su uso.

### 3.3.7. PCR a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real permite una monitorización continua de todo el proceso de la PCR gracias a la incorporación de un fluoróforo. De esta forma, la cuantificación del producto puede realizarse en etapas tempranas de amplificación donde existe una relación lineal entre el molde de partida y la cantidad de amplicón generado en el ciclo, al contrario de lo que ocurre en la PCR convencional donde solo puede cuantificarse la cantidad final de producto generada.

En este trabajo se utilizó la técnica de PCR a tiempo real para el análisis de la expresión génica mediante la cuantificación relativa del mRNA previamente retrotranscrito a cDNA de cada gen específico respecto a la del gen de referencia *rnpB* que codifica la RNasa P de *Anabaena* sp. PCC7120 y cuyos niveles de expresión se mantienen invariables durante el crecimiento del cultivo en distintas condiciones (Vioque, 1992).

Los análisis de PCR a tiempo real se realizaron en los Equipo Viia 7 o QuantStudio5, utilizando como fluoróforo el reactivo SYBR<sup>®</sup> Green. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada gen se diseñaron con el software Primer express (Applied Biosystems) y se muestran en la Tabla suplementaria S1. Los resultados se analizaron con los softwares “QuantStudio™ Real-Time PCR software” y “QuantStudio™ Design & Analysis software”

Las reacciones de PCR se hicieron por triplicado para cada muestra utilizando placas de 96 pocillos de 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de volumen total. Además de las réplicas técnicas cabe mencionar que se realizaron además tres réplicas biológicas en cada caso. En cada pocillo se añadían 20  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción para cada gen de estudio que contenía 12,5  $\mu\text{L}$ /pocillo de Power SYBR™ Green Máster Mix, 0,2  $\mu\text{L}$ /pocillo de primer reverso (25  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$ /pocillo de primer directo (25  $\mu\text{M}$ ) y 7,1  $\mu\text{L}$ /pocillo de agua libre de RNasas y posteriormente se añadían 10  $\mu\text{L}$  del cDNA de interés preparado a una dilución (1/50) con agua libre de RNasas. Esta dilución se escogió para la mayoría de los casos, a excepción de la amplificación de algunos genes que requirieron

una dilución 1/10. La cantidad adecuada se escogió tras realizar una recta patrón para cada gen mediante la amplificación de diferentes diluciones de cDNA.

El programa de PCR utilizado fue el mismo para todos los genes y constaba de: una etapa inicial de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos compuestos por dos pasos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C, seguidos de la curva “*melting*” de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y finalmente 15 s a 95 °C.

La variación en la expresión génica (*fold change*) se calculó a partir de los valores Ct obtenidos por el programa utilizando el modelo matemático del  $\Delta\Delta Ct$  propuesto por (Livak and Schmittgen 2001). Los cálculos realizados se describen a continuación:

1. Se calculó la media de las réplicas técnicas
2. Se calculó  $\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen housekeeping})$
3. Se calculó  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra tratada} - \Delta Ct \text{ muestra control}$
4. Se obtuvo la variación de la expresión del gen o *fold change* respecto al gen “housekeeping” *rnpB*, que se calcula como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (en caso de que el valor obtenido sea menor que uno, se calcula el inverso y se cambia de signo).

Se fijó el umbral mínimo de significatividad del cambio de expresión en un valor *fold change* de  $\pm 1,5$ .

### **3.4. Métodos de transformación de *E. coli***

#### **3.4.1. Preparación de células de *E. coli* termocompetentes.**

Para la preparación de las células competentes de *E. coli* se inocularon 10 mL de medio líquido LB con una colonia de la cepa deseada y se incubó O/N a 37 °C con 180 rpm de agitación. Al día siguiente se refrescó el cultivo en 200 mL de medio LB y se dejó incubar en las mismas condiciones (37 °C y 180 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O. a 600 nm = 0,3-0,4). En este momento se interrumpió el crecimiento del cultivo incubándolo durante 20 min en hielo. Se centrifugaron las células en tubos de centrifuga previamente esterilizados y preenfriados durante 10 min a 3080 x *g* y 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron cuidadosamente en 1 mL de tampón 1 preenfriado (CaCl<sub>2</sub> 14,7 g/L, MgCl<sub>2</sub> 14,23 g/L, acetato sódico 3,28 g/L (pH 5,5)), se añadieron 19 mL del mismo tampón y se mezcló con suavidad. Las células se recogieron de nuevo por centrifugación durante 10 min a 3080 x *g* y 4

°C y se resuspendieron cuidadosamente en 4 mL de tampón 2 preenfriado (CaCl<sub>2</sub> 14,7 g/L, glicerol 15 %). Las células resuspendidas se distribuyeron en alícuotas de 200 µl y se congelaron inmediatamente a -80 °C para su conservación.

### **3.4.2. Transformación de *E. coli* mediante choque térmico**

Sobre una alícuota de 200 µL de células competentes recién descongeladas en hielo se añadió el DNA a introducir (aproximadamente entre 50-100 ng) o H<sub>2</sub>O MQ estéril para el control negativo y se incubó durante 15 min en hielo tras homogenizar suavemente. Seguidamente, se sometió a las células a un choque térmico de 42 °C durante 90 s en un termobloque e inmediatamente se colocaron los tubos en hielo donde se mantuvieron 3 min. A continuación, se añadió a las células 800 µL de medio LB sin antibiótico y se incubaron entre 45 min-1 h a 37 °C y 180 rpm de agitación. Para finalizar se sembraron las células en placas de medio LB 1,5 % agar con el antibiótico adecuado. Generalmente para cada transformación se utilizaron dos placas, en la primera se sembraron 200 µl y en la segunda el resto del cultivo concentrado hasta 200 µl tras centrifugar 1 min a 16500 x g y eliminar parte del sobrenadante.

## **3.5. Sobreexpresión y purificación de FurC recombinante de *Anabaena* sp. PCC7120**

### **3.5.1. Sobreexpresión de FurC y obtención de biomasa.**

Para la sobreexpresión de FurC se eligió la cepa *E. coli* BL21 (DE3) junto con el sistema pET (Novagen). El plásmido utilizado, pET-28a(+), es un vector que proporciona una gran cantidad de proteína recombinante gracias a la potencia del promotor del bacteriófago T7, bajo cuyo control se expresa el gen de interés. A dicho promotor se une la T7-RNA polimerasa, cuyo gen está codificado en el DNA cromosómico de la cepa de *E. coli* BL21 y cuya expresión se induce con IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido).

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) se transformaron mediante choque térmico (apartado 3.4.2) con el plásmido de sobreexpresión de *furC* de *Anabaena* sp. PCC7120 pET28a::*furC* previamente construido (Hernandez et al., 2004a).

#### **3.5.1.1. Optimización de la expresión de FurC**

Para la producción de las proteínas de este trabajo se realizó previamente una prueba de sobreexpresión a pequeña escala previa a la producción de biomasa para comprobar que la

colonia transformada era capaz de sobreexpresar la proteína y para optimizar las condiciones de sobreexpresión (tiempo de inducción, temperatura). El protocolo a seguir fue el siguiente:

- 1) Entre 3-4 colonias de *E. coli* BL21 (DE3) recién transformadas con el constructo pET28a::furC se inoculan en 10 mL de LB Km (medio LB con 50 µg/mL de kanamicina) y se dejan incubar durante O/N a 37 °C y 200 rpm. Además, estas mismas colonias se replican al mismo tiempo en una placa de LB Km agar para poder disponer de ellas tras la prueba de sobreexpresión.
- 2) A la mañana siguiente los cultivos de cada colonia se refrescan con un inóculo al 2 % en 10 mL de medio LB Km en un tubo Falcon y se incuban a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,6-0,7 (entre 3-4 h aproximadamente).
- 3) Una vez alcanzada esa D.O. a 600 nm, se traspasan 5 mL de cada cultivo a un Falcon nuevo y se induce con 1 mM de IPTG (5 µl IPTG 1 M).
- 4) Se incuban todos los cultivos (inducidos y sin inducir) a 37 °C, 180 rpm durante 3-4 h u O/N a 15 °C y 150 rpm.
- 5) Se comprueba por SDS-PAGE (apartado 3.6.4) cuál de las colonias sobreexpresa más proteína para lo que se prepara la muestra tal como se describe a continuación:
  - a) Se añade 1 mL de cada cultivo en un Eppendorf, se centrifuga 5 min a velocidad máxima y se elimina el sobrenadante
  - b) Se resuspende el precipitado en 80 µl de agua MQ y 20 µl de tampón de carga 5x con β-mercaptoetanol cuya composición 1x es (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 1 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,02 % (p/v))
  - c) Se hierve 5 min a 97 °C
  - d) Se agita en vortex 10 s y se centrifuga 5 min a 16500 x g
  - e) Se cargan 10 µl del sobrenadante en el pocillo del gel de SDS-PAGE al 17 %
  - f) Se realiza la electroforesis a 35 mA/gel durante aproximadamente 45-50 min.

### 3.5.1.2. Inducción de la sobreexpresión y obtención de biomasa

Una vez optimizada la sobreexpresión de la proteína, se seleccionó la colonia que mostró mejor rendimiento y se siguió el siguiente procedimiento:

- 1) A partir de la estría de la placa réplica de la colonia que más sobreexpresaba se inoculan 10 tubos Falcon que contienen 20 mL de LB Km y se incuban O/N a 37 °C y 200 rpm.

- 2) Se refrescan los cultivos a la mañana siguiente con un inóculo al 1 % en 1L de LB Km en frascos Erlenmeyer de 2 L de capacidad.
- 3) Se incuban a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,7, momento en el que se induce la sobreexpresión de la proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM.
- 4) Los cultivos se incuban entre 3-4 h a 37 °C y 180 rpm u O/N a 15 °C y 150 rpm.
- 5) Una vez transcurrido el tiempo de inducción los cultivos se centrifugan a 11000 x g a 4 °C durante 7 min y se descarta el sobrenadante.
- 6) Las células se recogen con una espátula en tubos de Falcon, se pesan y congelan a -20 °C hasta su uso.

### **3.5.2. Purificación de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120**

#### **3.5.2.1. Fundamentos de las técnicas cromatográficas utilizadas**

Durante la realización de esta tesis doctoral se pusieron a punto dos protocolos de purificación, donde se utilizaron las cromatografías de intercambio iónico en matriz DEAE-celulosa y cromatografía de afinidad por heparina

##### **3.5.2.1.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE**

La cromatografía de intercambio iónico es un método utilizado para la separación de las moléculas en base a su densidad de carga eléctrica. Esta técnica se basa en un intercambio reversible de iones en solución con iones unidos electrostáticamente a un soporte o matriz insoluble. Cuando la muestra de proteínas entra en la matriz de la columna, los grupos funcionales de las proteínas con carga opuesta a la de la matriz se unen de forma reversible pudiendo ser eluidas secuencialmente de forma específica con un gradiente de creciente fuerza iónica o diferente pH. En este trabajo, se decidió trabajar a pH fisiológico y debido a que FurC presentaba carga negativa a este pH, se seleccionó un intercambiador de tipo aniónico débil, dietilaminoetil (DEAE) en una matriz de DEAE-celulosa. Los grupos dietilaminoetil, presentan carga positiva, de modo que son capaces de interaccionar con FurC al pH de la purificación seleccionado que fue pH 7,5.

##### **3.5.2.1.2. Cromatografía de heparina**

La cromatografía de afinidad a heparina es un método ampliamente utilizado para la purificación de proteínas de unión a ácidos nucleicos, y en concreto un paso comúnmente

utilizado en los protocolos de purificación de algunas proteínas de la familia FUR (Lopez-Gomollon et al., 2007, Hernandez et al., 2004a, Lee & Helmann, 2006a, Martin-Luna et al., 2006). La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfonado, cuya estructura imita a la estructura polianiónica del ADN. De esta manera, algunas proteínas de unión al DNA son capaces de interactuar con ella, en un tipo de interacción que se debilita con un aumento en la fuerza iónica. En el caso de FurC, esta había mostrado capacidad de unión a la matriz de heparina en trabajos anteriores de nuestro grupo, por lo que se seleccionó esta técnica para su puesta a punto como método de purificación complementario a la cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de heparina se realizó como primera o segunda etapa de la purificación de FurC (ver más abajo). Dependiendo de la etapa, FurC mostró una afinidad variable por la matriz de heparina por lo que las condiciones de fuerza iónica y flujo utilizadas se ajustaron para cada procedimiento utilizado.

### **3.5.2.2. Montaje y equilibrado de las columnas.**

Todas las columnas cromatográficas utilizadas a excepción de las preempaquetadas se prepararon manualmente a Tª ambiente. Inicialmente, las matrices preservadas a 4 °C se dejaron atemperar antes de comenzar el montaje para evitar formar burbujas en la columna debido al cambio de temperatura. Para la cromatografía de intercambio iónico con DEAE se utilizó el lecho *DEAE-50* de Whatman®. Para la cromatografía de heparina se utilizaron los lechos *Heparin Sepharose™ 6 Fast Flow* de Cytiva o *HP Resin Heparin Agarose* de ProteinArk®. Se utilizaron columnas de cristal BIORAD de 20-35 mL de capacidad y 1,5 cm Ø con 15-20 mL de resina empaquetada.

La resina se empaquetó en todos los casos primero por gravedad y a continuación aplicando agua destilada a un flujo de 5 mL/min con una bomba peristáltica. Una vez empaquetada, se pasaron 10 vol. de agua destilada para eliminar el etanol en el que estaba preservada la matriz. Finalmente, se equilibró la columna pasando 10 vol. del tampón de purificación correspondiente. La columna equilibrada y todo el sistema de purificación se traspasó a la cámara fría o a la nevera donde se encontraba el sistema AKTA para así realizar las siguientes etapas de la cromatografía a 4 °C.

### **3.5.2.3. Obtención del extracto crudo a partir de biomasa**

Una vez equilibrada la columna correspondiente, se procedió a obtener el extracto crudo de proteína sobreexpresada libre de membranas. Para ello se descongelaron 10 gramos de biomasa

y se resuspendieron en 50 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ¼ de pastilla del cóctel de inhibidores de proteasas libre de EDTA, cOmplete™ (Roche). Las células se lisaron por sonicación con 10 ciclos de 45 s (intermitentes cada 0,5 s con amplitud del 85 %) y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, manteniendo las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. El lisado se centrifugó 54000 x g y 4 °C durante 1 h. Tras centrifugar, la fracción soluble se filtró por un filtro de 0,45 µm y se sometió inmediatamente a cromatografía.

#### **3.5.2.4. Purificación de FurC mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa seguida de cromatografía de heparina.**

##### Primera etapa cromatográfica: Columna de DEAE-Celulosa

- 1) Una vez obtenido el extracto proteico, este se aplica inmediatamente en la columna de DEAE previamente equilibrada en el tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM) a una velocidad de flujo de 3 mL/min (esta velocidad se empleará durante todo el proceso de purificación). Es importante recoger y conservar todas las fracciones que salen de la columna, para luego verificar por SDS-PAGE que la proteína se ha purificado correctamente.
- 2) Se aplican 5 vol. del tampón purificación para eliminar las proteínas unidas a la columna con baja afinidad.
- 3) Se eluye la proteína empleando un gradiente creciente de NaCl (0-0,5 M) en 100 mL del tampón de purificación.
- 4) El eluido se recoge en alícuotas de aproximadamente 1 mL cada una y se mantienen a 4 °C hasta su análisis mediante SDS-PAGE.
- 5) Las alícuotas conteniendo la mayor cantidad de proteína se juntan y dializan (apartado 3.6.1) en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 para llevar a cabo un segundo paso de cromatografía de heparina.

##### Segunda etapa cromatográfica: Columna de heparina

- 6) La totalidad del volumen de FurC tras la diálisis se carga en la columna de heparina previamente equilibrada en tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM)
- 7) Se aplican 6 vol. del tampón de purificación para eliminar la fracción no retenida.
- 8) Se eluye la proteína mediante un gradiente de elución creciente de NaCl (0-0,5 M) en 100 mL de tampón de purificación.

- 9) Durante la elución se recogen alícuotas 1 mL y se mantienen a 4 °C hasta su análisis mediante SDS-PAGE.
- 10) Las fracciones que contienen FurC se analizan mediante espectrofotometría realizando un espectro entre 230-340 nm para analizar la presencia de DNA. Las fracciones que contienen absorbancia mayoritaria a 280 respecto a 260, se juntan y se dializan en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl (apartado 3.6.1).
- 11) Para su conservación, la proteína se alicuota a razón de 10 y 200 µL y se conserva a -80 °C

#### **3.5.2.5. Purificación mediante cromatografía de heparina seguida de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa**

##### Primera etapa cromatográfica: Columna de heparina con elución isocrática.

- 1) Se pasa el extracto crudo recién obtenido por la columna de forma seriada, pasando 20 mL de extracto crudo a un flujo de 1 mL/min, seguidos de 20 mL de tampón de lavado, en este caso el mismo que el tampón de purificación: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM. Este ciclo se repite hasta cargar la totalidad del extracto crudo. Se recogen todas las fracciones para luego verificar por SDS-PAGE
- 2) Se aplican 3 vol. del tampón de purificación como lavado a una velocidad de flujo de 2 mL/min (velocidad que se utiliza para los siguientes pasos de la purificación).
- 3) Se eluye la proteína mediante elución isocrática con 0,3 M NaCl, pasando 4 vol. de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM. Las fracciones eluidas se recogen y analizan mediante SDS-PAGE.
- 4) Las fracciones que contienen FurC se juntan y se dializan (apartado 3.6.1) en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 para después continuar con la cromatografía de intercambio iónico por DEAE-celulosa.

##### Segunda etapa cromatográfica: Columna de DEAE-celulosa

- 5) La proteína parcialmente purificada por heparina y recién dializada se fija en la columna de DEAE-celulosa pasando la totalidad del volumen.
- 6) Se aplica un lavado con 10 vol. del tampón de lavado: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM.
- 7) Se realiza la elución de la proteína mediante un gradiente 0,1-0,7 M NaCl en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 6. vol. columna.
- 8) Se analizan las fracciones mediante SDS-PAGE.

- 9) Las fracciones que contienen FurC se analizan mediante espectrofotometría realizando un espectro entre 230-340 nm para descartar la presencia de DNA. Las fracciones que contienen absorbancia mayoritaria a 280 respecto a 260, se juntan y se dializan en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl (apartado 3.6.1).
- 10) Tras la diálisis la proteína se cuantifica mediante espectrofotometría (apartado 3.6.3).
- 11) Para su conservación, la proteína se alícuota a razón de 10, 200  $\mu$ L según su uso y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación a -80 °C Para su conservación a largo plazo, en algunos casos se añadieron 5 % de glicerol.

### **3.5.2.6. Cromatografía de exclusión molecular.**

#### 3.5.2.6.1. Cromatografía a escala analítica en columna de Superdex™ 200 Increase 10/300.

Para el estudio del estado oligomérico en solución de FurC y la optimización de las condiciones para la purificación de FurC en forma dimérica se utilizó la cromatografía de exclusión molecular a escala analítica utilizando la columna Superdex™ 200 Increase 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). La columna previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 10 %, se acopló al cromatógrafo de alta presión Pharmacia Akta purifier situado en una nevera a 4 °C. Este instrumento permitió monitorear la absorbancia a 280 nm y mantener un flujo constante de 0,5 mL/min. Se cargaban entre 100-200  $\mu$ L de muestra previamente incubados con diferentes condiciones indicadas en cada caso. En los casos indicados al tampón de purificación se añadió 0,5 mM de TCEP para mantener a la proteína en condiciones reductoras tras la purificación o se eliminó el glicerol del tampón de purificación. Durante la elución se recogieron alícuotas de las fracciones deseadas y se concentraron para el análisis del estado oligomérico mediante SEC-MALLS-RI (apartado 3.7.2) o su análisis mediante SDS-PAGE (apartado 3.6.4).

#### 3.5.2.6.2. Cromatografía de exclusión molecular a escala preparativa

Para la purificación de FurC dímero mediante cromatografía de exclusión molecular para ensayos de cristalización, se utilizó la cromatografía de exclusión molecular a escala preparativa en las columnas Superdex™ 75 16/600 o Superdex™ 75 26/600 (GE Healthcare Life Sciences) equilibradas en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,5 mM TCEP. Previo a la cromatografía, se incubaron entre 4-5 mL de la proteína recién purificada y dializada en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM mediante las cromatografías de heparina y DEAE-celulosa con 0,5-1 M de NaCl durante 30 min y con DTT durante 10 min para favorecer la conformación dimérica de la

proteína. Es importante no alargar en exceso el tiempo de incubación con DTT porque la proteína puede llegar a reoxidarse. La cromatografía transcurrió a un flujo de 2 mL/min. Se recogieron las fracciones de la purificación a razón de 2-3 mL y se analizaron por SDS-PAGE (apartado 3.6.4). Las fracciones que correspondían con la forma más pura de FurC dímero a juzgar por el cromatograma se juntaban y concentraban hasta una concentración de 9-10 mg/mL (apartado 3.6.2).

### **3.6. Técnicas analíticas de proteínas**

#### **3.6.1. Diálisis de proteínas.**

Para efectuar las diálisis se emplearon membranas de diálisis con tamaño de exclusión de 10 kDa, que se sumergían en un vaso de precipitados con un volumen de tampón al menos 100 veces superior al de la muestra a dializar. Las diálisis se realizaban siempre a 4 °C y en agitación, con un paso de al menos 4 h a 4 °C, y un segundo paso de diálisis O/N tras renovar el tampón.

#### **3.6.2. Concentración de proteínas**

Para la concentración de proteínas se utilizaron tubos “Amicon® Ultra” (Millipore) o “VivaSpin” (Sartorius) con un tamaño de poro de 3 kDa y 5 kDa respectivamente y de formato Eppendorf o formato de tubo de 50 mL. Este sistema impide que moléculas con un peso molecular superior al tamaño de poro atraviesen la membrana del dispositivo, de forma que se concentran sobre la misma. Previo a su uso, se aclaró la membrana con agua destilada y se equilibró con el tampón de interés centrifugando a 3080 x *g* durante 10 min y 4 °C. Posteriormente se cargó la muestra y realizaron ciclos de concentración, centrifugando a 3080 x *g* y 4 °C durante 5 min y homogeneizando la muestra mediante pipeteo entre cada ciclo, hasta alcanzar la concentración deseada.

Otro método de concentración utilizado, aunque en menos frecuencia fue la concentración por sacarosa. Para ello, se introducía la muestra de proteína en una membrana de diálisis y esta se colocaba en un recipiente y se cubría con sacarosa por completo. Se realizaban cambios de la sacarosa cada 15 min para retirar la sacarosa húmeda y evitar disolver la sacarosa en la solución de proteína. Cuando el volumen de muestra de la membrana había disminuido hasta el nivel deseado. La muestra se dializaba en la misma membrana de diálisis para dejarla en el tampón deseado (apartado 3.6.1).

### 3.6.3. Cuantificación de proteínas

Para muestras de proteína purificada el método más utilizado fue la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta utilizando para ello un espectrofotómetro de doble haz SPECORD 250 PLUS (Analytik Jena) o Cary 100 Bio y empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz (Hèllma). Tras la medida, se aplicó la ley de Beer-Lambert:  $Abs = \epsilon l C$ . Así se relaciona la concentración de una sustancia,  $C$  (M), con su absorción, donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) y  $l$  representa el paso óptico (1 cm). Las proteínas presentan un máximo de absorción en torno a 280 nm debido a la presencia de residuos aromáticos, especialmente triptófanos. La concentración de cada proteína se calculó utilizando un  $\epsilon$  teórico obtenido mediante el servidor ExPASy (<http://au.expasy.org>). Para FurC, el valor utilizado en este trabajo fue  $\epsilon$  (280 nm) =  $14440 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . A pesar de que la concentración de proteína se calcula a partir de solo una longitud de onda, fue aconsejable realizar un espectro entre 230-350 nm para observar el pico completo de la proteína y poder determinar a simple vista su pureza. Para los ensayos de cristalización, las muestras se cuantificaron empleando un equipo Nanodrop. Comúnmente no es aconsejable utilizar este aparato para la cuantificación de proteínas, pero para muestras muy concentradas, resulta una medida más exacta permitiendo además no gastar muestra en exceso.

### 3.6.4. Electroforesis de proteínas en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizante se realizó en geles de poliacrilamida siguiendo el procedimiento basado en el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando los dispositivos de electroforesis vertical Mighty Small II SE250 / SE260 (Hoefer) o Mini-Protean 3 Cell (Bio-rad). Los geles de poliacrilamida presentan un gel de concentración (parte superior) y un gel de separación (parte inferior). En este trabajo, para el gen concentrador se utilizó una concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) de un 5 % (p/v) y para el gel separador un porcentaje de poliacrilamida variable entre 12-17 %. La composición de los geles preparados se describe en la Tabla 7.

**Tabla 7. Composición de los geles desnaturizantes de poliacrilamida.** Se detallan las cantidades de reactivos necesarias para preparar 2 geles del 15 y 17 % que fueron los utilizados en la mayoría de los casos.

Reactivo	Gel separador 15 %	Gel separador 17 %	Gel concentrador 5 %
H <sub>2</sub> O	1,06 mL	0,72 mL	2,8 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,36 mL	4,48 mL	--
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	--	--	0,5 mL
Acrilamida:Bisacrilamida 30 %	4,5 mL	6,8 mL	0,6 mL
SDS 10 % (p/v)	45 µl	60 µl	20 µl
PSA 10 % (p/v)	30 µl	40 µl	20 µl
TEMED	15 µl	20 µl	20 µl

Para la preparación de las muestras se añadió tampón de carga 5x (SB5X) cuya composición final fue 50 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 1 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0,02 % o tampón de carga con la misma composición, pero sin el agente reductor β-mercaptoetanol. A continuación, se hirvieron las muestras 5 min a 95 °C para desnaturizar las proteínas y se centrifugaron 2 min a velocidad máxima para su posterior aplicación en los pocillos del gel. Como patrón de peso molecular se utilizaron los marcadores (PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder). En el caso de que el gel fuera a emplearse para Western blot, se utilizó el marcador preteñido BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder.

La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente en un dispositivo para electroforesis vertical Mighty Small II SE250 / SE260 (Hoefer) que utiliza un sistema de recircularización continua de agua para evitar el sobrecalentamiento o en un sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad). Los geles corrieron a un amperaje constante de 35 mA por gel durante 45-50 min, en un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM, SDS 3,5 mM.

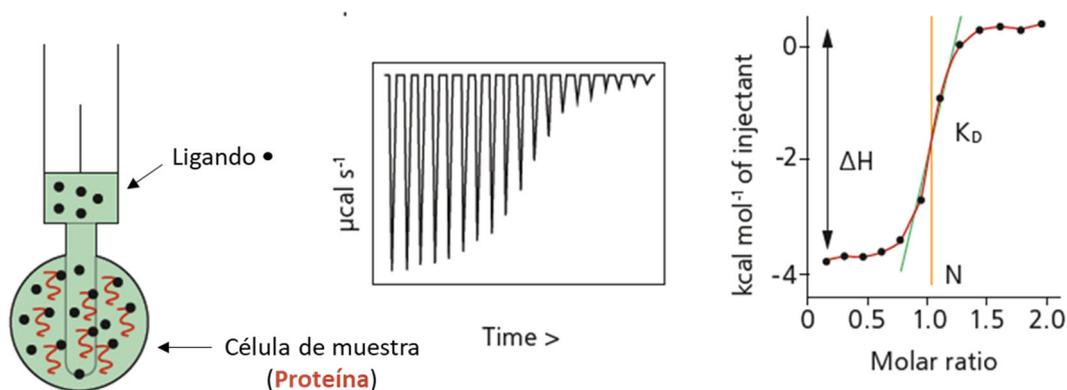
### 3.7. Técnicas de caracterización biofísica

#### 3.7.1. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Los experimentos de ITC se realizaron en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) en colaboración con el Prof. Dr. Adrián Velázquez-Campoy. Esta técnica permite estudiar la interacción entre una proteína y un ligando determinando cuantitativamente, la estequiometría, entalpía de formación y constante de unión de la interacción entre dos especies mediante la medición directa del calor liberado o absorbido a presión constante durante la

interacción de dos moléculas. Esta técnica se ha aplicado al estudio de interacciones del tipo proteína-proteína; proteína-ligando y proteína-DNA/RNA (Ladbury & Chowdhry, 1996). En este trabajo se empleó para analizar la interacción de FurC con los metales divalentes  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ .

Los experimentos de ITC se basan en inyecciones seriadas de cantidades crecientes de ligando (el cual se encuentra en la jeringa del equipo) sobre la célula de muestra donde se encuentra la proteína, mientras que la célula de referencia contiene el tampón utilizado, el cual debe ser estrictamente el mismo tanto en la jeringa como en la célula para que no exista intercambio de calor generado por diferencias en el tampón. Al ir inyectando cantidades crecientes de ligando sobre la célula de muestra se genera o se absorbe calor como consecuencia de la interacción proteína-ligando. La reacción se realiza en condiciones isotérmicas por lo que el sistema debe aportar o retirar calor para mantener las células de muestra y referencia a la misma temperatura. La medición del calor ( $\mu\text{cal/s}$ ) que hay que aportar para mantener constante la diferencia de temperatura entre la célula de muestra y la de referencia nos permite obtener una curva a partir de la que se pueden calcular los parámetros que caracterizan la interacción proteína-ligando (Figura 13). En las primeras inyecciones la mayor parte del ligando se une a la proteína por lo que las señales son mayores que las obtenidas en las últimas inyecciones cuando la proteína está saturada.



**Figura 13. Fundamentos del ensayo de ITC.** Cada inyección de ligando en la célula de muestra que contiene la proteína da como resultado un pulso de calor que integrado en términos de tiempo y normalizado para la concentración genera una curva de titulación de Kcal/mol vs. ratio molar (ligando/muestra). La isoterma obtenida se ajusta a un modelo de unión para obtener los datos de afinidad ( $K_d$ ), estequiometría ( $N$ ) y entalpía de la interacción ( $\Delta H$ ). Figura adaptada de (<https://www.malvernpanalytical.com/es>)

Todos los análisis de ese trabajo se realizaron a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . La célula de muestra contenía proteína a una concentración entre  $10\text{-}20\text{ }\mu\text{M}$  y la jeringa de inyección el ligando a  $100\text{-}200\text{ }\mu\text{M}$ ,

encontrándose ambos disueltos en el mismo tampón de trabajo: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Además, se evaluó el efecto de diferentes agentes reductores u oxidantes como el DTT a 1 mM, TCEP 2 mM o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 500 μM y el efecto de la presencia de MnCl<sub>2</sub> a una concentración de 100 μM. En todos los casos, los agentes reductores u oxidantes y los metales se añadieron en todas las disoluciones del experimento para evitar cualquier intercambio de calor generado por diferencias en el tampón. Además, fue necesario desgasear las disoluciones finales de proteína, ligando y tampón durante 2 min a 10 °C en un sistema Thermovac de Microcal, para evitar la posterior formación de burbujas en la célula que podrían distorsionar la medida. El análisis de los datos se realizó con el programa Origin-ITC (Microcal), utilizando modelos de ajuste a uno o dos sitios de unión.

### **3.7.2. Cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a la medición de dispersión multiangular de luz láser e índice de refracción a tiempo real (SEC-MALLS-RI).**

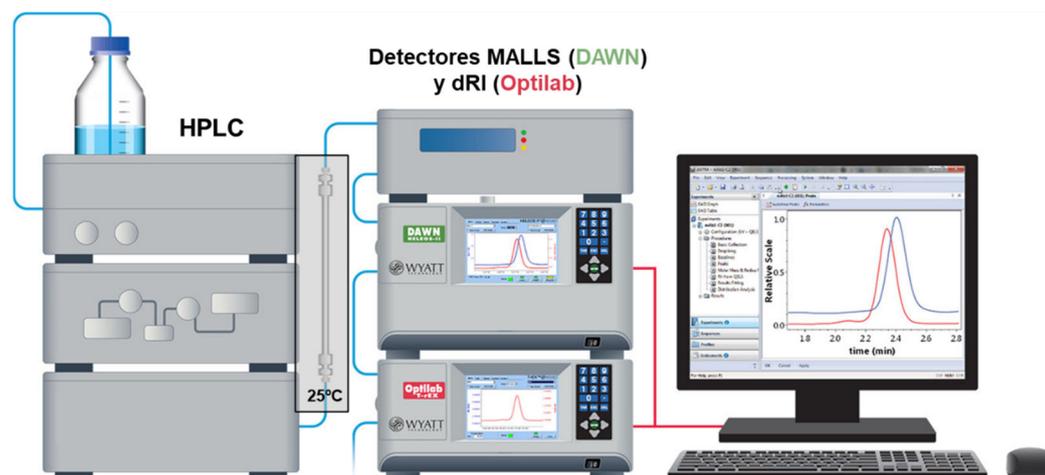
Con el objetivo de determinar la masa molecular y el estado oligomérico en solución de FurC purificada previamente mediante filtración en gel se utilizó la técnica SEC-MALLS-RI. Los análisis se realizaron en el LCBM (*Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux*, CEA-Grenoble, Francia) en colaboración con la Dra. Isabelle Michaud-Soret.

La técnica SEC-MALLS-RI combina un paso de cromatografía de exclusión molecular (SEC), con medidas a tiempo real (es decir, mientras la muestra eluye de la columna) del índice de diferencial de refracción (dRI) y la dispersión multiangular de luz láser de las moléculas en solución (MALLS). El detector dRI determina la concentración del analito en función del cambio en el índice de refracción de la solución en la que está presente. Sabiendo que la variación en el índice de refracción se relaciona de forma constante con la variación en la concentración de proteínas de la muestra ( $dn/dc$ ), medir este índice de refracción permite acceder a la concentración ( $c$ ) de la proteína en cualquier punto de la elución. Una vez conocida esta concentración, gracias a la determinación de la dispersión multiangular de luz láser (MALLS) podemos determinar la masa molecular de las especies en solución conforme eluyen de la columna. Estos cálculos se fundamentan en la ecuación de Rayleigh la cual relaciona la masa molar ( $M$ ), con la concentración del analito ( $c$ ) determinada por el detector UV o dRi, el incremento del índice de refracción de la proteína ( $dn/dc$ ), la dispersión de luz  $R_{\theta}$ , la cual es medida por los detectores MALLS junto con la constante óptica ( $K$ ), también calculada por el

equipo, que depende de las propiedades del sistema, como la longitud de onda utilizada y el índice de refracción del tampón utilizado (Wyatt, 1993)

$$M = \frac{R_{\theta}}{Kc \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}$$

Como se ha comentado, esta técnica está acoplada a una cromatografía de exclusión molecular para asegurar la correcta homogeneidad de la muestra y separar posibles tamaños diferentes cuando se estudia una mezcla de macromoléculas en una solución. Para ello se utilizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna de filtración en gel Superdex™ 200 Increase 10/300 (GE Healthcare Life Sciences). La dispersión de luz se midió en 17 ángulos diferentes con el detector DAWN® HELEOS® II (Wyatt Technology Corp., Santa Bárbara, CA) utilizando un láser de 692 nm. Para la medición del índice de refracción (dRI) se utilizó el refractómetro diferencial Optilab T-rex (Wyatt Technology Corp., Santa Bárbara, CA) el cual mide la diferencia de refracción entre una celda de control y la celda de muestra. Los datos adquiridos fueron analizados por el software ASTRA 6.1 (Wyatt Technology Corp., Santa Bárbara, CA) con la ayuda del Dr. Roger Midas del LCBM en el centro CEA-GRENOBLE. En la Figura 14 se muestra una representación esquemática de un típico sistema de SEC-MALLS-RI.



**Figura 14. Representación esquemática de un típico sistema SEC-MALLS-RI para la determinación del peso molecular de una proteína.** El sistema consiste en un equipo HPLC que incluye la columna SEC, la cual está en línea con el detector de MALLS DAWN® HELEOS® II y el refractómetro Optilab T-rex. Todos los datos obtenidos se integran con el software Astra 6.1.

Para el análisis de las muestras, la columna SEC se equilibró previamente O/N a un flujo mínimo de 0,05 mL/min con el tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl, glicerol 10 % filtrado por 0,1  $\mu$ m. Una vez equilibrada la columna, el flujo se restauró a 0,5 mL/min durante al menos 1 h. Cuando se obtuvieron señales estables en todos los detectores, se inyectaron 20  $\mu$ L de la muestra previamente centrifugada a una concentración entre 0,5-2 mg/mL. Todas las separaciones se realizaron a 20 °C y a un flujo de 0,5 mL/min para obtener la mejor separación y el menor ruido posible.

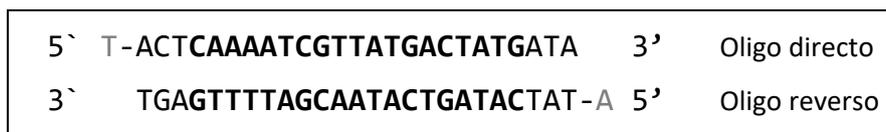
### 3.8. Aproximación a la cristalización de FurC y del complejo FurC-DNA

Los experimentos de cristalización de FurC se comenzaron mediante ensayos automatizados en el laboratorio de cribado de alta resolución de cristalización “*High Throughput Crystallization Laboratory*” (HTXLab. Grenoble, Francia) (<https://htxlab.embl.fr/>) del EMBL “*European Molecular Biology Laboratory*” en Grenoble. Este laboratorio proporciona a través del Sistema de gestión de información de cristalización (CRIMS ©), una plataforma automatizada de cribado de cristalización que se utiliza para la caracterización *in situ* y la recolección automática de cristales. Este sistema utiliza el método de gota sentada en placas CrystalDirect™ donde el robot dispone 3 gotas de 0,1  $\mu$ L en pocillos con 45  $\mu$ L de reservorio. Se proporcionó al HTXLab una muestra de 75  $\mu$ L de solución de proteína (previamente centrifugada para evitar agregados) a una concentración de 9 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 0,5 mM. La búsqueda de las primeras condiciones de cristalización de FurC se realizó con los kits JCSG++, PEG/Salt, Wizard, Basic, PACT++ y Classic (Jena Bioscience). Las placas se mantuvieron a 20°C. El sistema tomó fotos regularmente durante un máximo de 90 días, que fueron revisadas en colaboración con la Dra. Christine Cavazza del grupo Biocat del LCBM en CEA Grenoble.

Los ensayos de cristalización se continuaron de forma manual en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) en Zaragoza en colaboración con la Dra. Prof. Marta Martínez Júlvez, siguiendo con las pruebas de cristalización de FurC sola y realizando nuevas pruebas para la cristalización de FurC con DNA.

Para cristalizar la proteína unida al DNA, se utilizó la secuencia de la caja FurC descrita para el promotor del gen *prxA* (apartado 4.4.1.1). Para ello se adquirieron oligonucleótidos purificados por HPLC (Biomers) y se sometieron a un protocolo de hibridación (ver más abajo) para obtener el fragmento de dsDNA deseado. Los oligonucleótidos se diseñaron siguiendo algunas de las recomendaciones encontradas en la literatura (Brown & Freemont, 1996). Se

recomienda emplear el fragmento funcional con el menor tamaño posible, incluyendo únicamente de 1 a 5 bases adicionales flanqueando a la secuencia consenso de unión de la proteína. En este caso se incluyeron tres bases a cada lado de la caja FurC. También se incluyó una base desapareada en el extremo 5' de cada uno de los oligonucleótidos, para favorecer el empaquetamiento de los fragmentos de dsDNA una vez hibridados los oligonucleótidos y formar lo que se denomina hélice semi-continua. Los fragmentos diseñados se muestran en la Figura 15.



**Figura 151. Oligonucleótidos diseñados para la cristalización de FurC unida al DNA.** Se muestran en negrita las bases correspondientes a la caja Fur y, en gris, las bases desapareadas.

Los oligonucleótidos se disolvieron en tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM) y se mezclaron los mismos moles de cada uno de ellos en un tubo Eppendorf. Para hibridarlos, se calentó la mezcla durante 5 min a 95 °C en el termobloque y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Los oligos hibridados se guardaron a 4 °C.

Para los ensayos de cristalización de FurC con DNA, la proporción DNA/proteína utilizada fue de 1,3 moles de DNA por mol de dímero de FurC. La proteína a una concentración final de 8,2 mg/mL se incubó con 10 mM DTT o 1 mM TCEP, con 1 mM de MnCl<sub>2</sub> y con el DNA. La mezcla se incubó durante 30 min-1 h a temperatura ambiente. A continuación, las mezcla FurC-DNA y FurC sola a la misma concentración incubada también con reductor y MnCl<sub>2</sub> se dispusieron en las diferentes placas de cristalización.

Para el cribado manual de condiciones realizado en el Instituto BIFI con FurC y FurC-DNA, se utilizó el método de gota sentada y placas de 96 pocillos con gotas de 0,5 µL de líquido madre y 0,5 µL de proteína o variaciones en la proporción (1:1, 1:2 ó 2:1 v/v). Las gotas se equilibraron frente a 60 µL de líquido madre. Se utilizaron los kits comerciales PEG/Salt (Jena Bioscience) y Morpheus, ProPlex y Midas (Molecular Dimensions), con 96 condiciones diferentes cada uno.

Para los ensayos de optimización de los cristales encontrados en la condición "PEG 6000 15 %, MPD 5 %, MES 0,1 M pH 6,5" se utilizaron placas de 48 pocillos de gota sentada con gotas de 1 µL de líquido madre + 1 µL de proteína equilibradas con 200 µL de líquido madre. En la

siguiente etapa de optimización se utilizaron placas de 24 pocillos de gota colgante con gotas de 1  $\mu\text{L}$  de líquido madre y 1  $\mu\text{L}$  de proteína o variaciones en la proporción (1:1, 1:2 ó 2:1 v/v). Las gotas se equilibraron frente a 500  $\mu\text{L}$  de líquido madre. Se probaron variaciones en porcentaje de PEG 6000 de entre 11 y 21 % y en el pH de 5,5 a 8.

En todos los casos, antes de mezclar la proteína con el DNA o reactivos, la solución de proteína se centrifugó a 16500 x *g* durante 2 min para evitar agregados o precipitación de esta. Las placas de cristalización se mantuvieron a 18 °C. El seguimiento de las placas de cristalización se realizó con una lupa de 40-100 aumentos, tomando imágenes con una cámara de móvil. Los cristales que alcanzaron un tamaño y calidad adecuados fueron recogidos por la Prof. Dra. Marta Martínez Júlvez en *loops* proporcionales a su tamaño y sumergidos en una disolución crioprotectora. Se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron en un Dewar. Posteriormente se enviaron para su difracción a las instalaciones de radiación sincrotrón ALBA en Barcelona en la línea 13 (XALOC).

### 3.9. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

Los ensayos de retardo en gel son de gran utilidad para el estudio de reguladores transcripcionales dado que permiten detectar si una proteína se une a un determinado fragmento de DNA, ya que el complejo que se forma provoca una disminución en la movilidad electroforética del DNA con respecto al DNA libre. Estos ensayos se realizan en presencia de un DNA competidor (inespecífico) para confirmar que la interacción es específica.

Los fragmentos de DNA utilizados en este trabajo consistieron en secuencias de entre 250-350 pb de las regiones *upstream* de diferentes genes de *Anabaena* sp. PCC7120, en las que se incluían entre 10-40 pb *downstream* del codón de inicio de dichos genes. Además, en todos los casos se utilizó como DNA inespecífico un fragmento interno de aproximadamente 150 pb del gel *pkn22* de *Anabaena* sp. PCC7120. Estos fragmentos se obtuvieron mediante amplificación por PCR (apartado 3.2.2) con los oligonucleótidos descritos en la Tabla suplementaria S1. Se utilizaron geles no desnaturalizantes con un porcentaje de poliacrilamida del 6 %, el cual proporciona un entrecruzamiento lo suficientemente bajo como para permitir la migración de los complejos DNA-proteína. La composición de los geles se resume en la Tabla 8.

**Tabla 8. Composición de los geles no desnaturalizantes de poliacrilamida.**

Se detallan las cantidades de reactivos necesarias para preparar 2 geles para cada porcentaje.

Reactivo	4 %	5 %	6 %	7 %	8 %
H <sub>2</sub> O (mL)	6,23	5,93	5,79	5,29	4,93
Acrilamida 30 %	1,33	1,67	2	2,33	2,67
R.B. 10x	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Glicerol 50 %	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
PSA 10 % (μL)	50	50	50	50	50
TEMED (μL)	30	30	30	30	30

Para la preparación de los geles y el desarrollo de la electroforesis se utilizó un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) y se realizó en el tampón de electroforesis R.B.10X cuya composición al 1X era: Tris-HCl 50 mM, glicina 380 mM, pH 8. Mientras se preparaban las muestras, se limpiaron los pocillos de los geles para eliminar posibles trazas de poliacrilamida y PSA presentes en el pocillo que pudiesen desestabilizar el complejo proteína-DNA y se precorrieron los geles a 60 V y 4 °C durante al menos 45 min para equilibrar los geles a la temperatura y tampón adecuados.

Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 μL, añadiendo 2 μL de tampón de unión 10x (composición del tampón 1x: Bis-Tris 10 mM pH 7,5, KCl 40 mM y 5 % glicerol) y 1 μL de BSA 1 mg/mL. De esta manera se simulaban las condiciones del interior celular. Además, cuando fue necesario se añadieron a la mezcla de reacción 1 mM DTT como agente reductor (a partir de una solución recién preparada el mismo día) y entre 0-100 μM de MnCl<sub>2</sub> o ZnSO<sub>4</sub>.

Inicialmente en las condiciones utilizadas para los ensayos de EMSA rutinarios se incluía en el tampón de unión 1 mM de DTT y 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en base a la metodología ampliamente utilizada en nuestro laboratorio. Posteriormente, los ensayos de EMSA se optimizaron añadiendo también 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en la composición del gel y en el tampón de electroforesis en base a un protocolo de EMSA utilizado para PerR de *B. subtilis* en el que utilizaban 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en la composición del gel además de en el tampón de unión. (Lee & Helmann, 2006b)

Las proteínas se añadieron siempre en último lugar, y la mezcla de reacción se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se limpiaron de nuevo los pocillos del gel y se

añadieron a las muestras 3  $\mu$ L del tampón de carga (Bis-Tris 30 mM pH 8, glicerol 30 % y azul de bromofenol 0,05 % (p/v)). Posteriormente se aplicaron 18  $\mu$ L de las muestras en cada pocillo y la electroforesis transcurrió durante 1 h y 50 min a 90 V y 4 °C. A continuación, se tiñeron los geles durante 15 min a temperatura ambiente con una disolución compuesta por el revelador de ácidos nucleicos SYBR®Safe 10000X (Invitrogen) a una concentración 1X disuelto en 50 mL del tampón de electroforesis. Los resultados se visualizaron y registraron con un equipo GelDoc 2000 (Bio-Rad).

### **3.10. Técnicas inmunoquímicas**

#### **3.10.1. Producción de anticuerpos policlonales Anti-FurC**

##### **3.10.1.1. Purificación de FurC desde gel SDS-PAGE para la producción del antisuero anti-FurC**

La obtención de los anticuerpos de FurC se realizó al inicio de la tesis doctoral, cuando los procedimientos de purificación de FurC con alto grado de pureza aun no estaban optimizados. Por lo tanto, para obtener una fracción de FurC lo suficientemente pura para la obtención de anticuerpos anti-FurC, se puso a punto un método de purificación a partir de electroelución de la banda de proteína aislada desde un gel SDS-PAGE.

###### **3.10.1.1.1. Preparación de geles y electroforesis**

Con el objetivo de cargar la mayor cantidad de proteína para obtener el máximo rendimiento, se prepararon geles preparativos. Para ello se utilizaron separadores específicos de 1,5 mm de grosor y un peine del mismo grosor en el que se unieron todos los pocillos menos los de los extremos. Se utilizó un gel separador al 17 % de acrilamida:bisacrilamida y un gel concentrador al 5 % de aproximadamente 2 cm de alto para facilitar la concentración de toda la proteína presente en el volumen de muestra. Las mezclas para la preparación de geles se resumen en el apartado 3.6.4.

La proteína FurC parcialmente purificada mediante un primer paso de cromatografía de DEAE-celulosa (apartado 3.5.2.4) se concentró hasta 3 mg/mL. A continuación, 1 mL de la solución se mezcló con 200  $\mu$ L de tampón de electroforesis SB5X y se cargó en el pocillo del gel. La electroforesis transcurrió a un amperaje de 30 mA.

#### 3.10.1.1.2. Identificación y corte de la banda de interés.

Una vez terminada la electroforesis, se cortó 1 cm de los extremos de cada gel y estos se tiñeron con Coomassie. Mientras tanto, la parte del gel sin teñir se aclaró con agua. Una vez desteñidos los fragmentos de los extremos estos se colocaron junto con el gel en su posición original y se trazaron 2 líneas que acotaban la posición de la proteína. Las bandas correspondientes se recortaron y se guardaron en tubos Falcon a 4 °C hasta su uso.

#### 3.10.1.1.3. Electroelución de la proteína de la matriz SDS-PAGE

Para la electroelución se introdujeron los fragmentos de gel recortados en una membrana de diálisis con tamaño de exclusión de 10 kDa y se añadieron 2 mL del tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. A continuación, se deshizo el gel suavemente con la yema de los dedos dentro de la membrana de diálisis. Posteriormente, se cerró la membrana de diálisis y se pegaron los extremos al fondo de una cámara de electroforesis horizontal. La cama de electroforesis se llenó con tampón de electroforesis Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM, SDS 3,5 mM y la electroforesis transcurrió en la cámara fría a 4 °C durante 4 h a 100 V y un último paso O/N a 30 V.

#### 3.10.1.1.4. Concentración y diálisis

Una vez finalizada la electroforesis, se sacó la mezcla de la membrana y se colocó en tubos Eppendorf para ser centrifugada a máxima velocidad y se filtró por un filtro de 0,22 µm para eliminar el resto de poliacrilamida. A continuación, la proteína se dializó en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. (apartado 3.6.1) y se concentró por sacarosa (apartado 3.6.2). La proteína posteriormente se cuantificó mediante espectrofotometría y se realizó un gel SDS-PAGE para asegurar su integridad y su pureza.

### **3.10.1.2. Obtención del antisuero frente a FurC**

Las fracciones de proteína purificadas se proporcionaron al servicio de Servicio de Cirugía Experimental del IACS para su empleo como antígeno. Se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda blancos, hembras, de 2 a 3 Kg de peso (3 meses de edad aprox.). El esquema de inmunización empleado constó de 3 dosis, separadas a intervalos de 21 días (0, 21, 42 d) con sangría final de los animales 7 días después de la última dosis. La primera dosis se realizó aplicando 1-2 mg de proteína recombinante (en 500 µL) mezclada con 1 vol. de adyuvante Completo de Freund. En el resto de las dosis se aplicaron 100-200 µg de proteína recombinante (en 500 µL) mezclada con 1 vol. de adyuvante Incompleto de Freund. Cada dosis de 1 mL (antígeno + adyuvante) se

repartió en 4 pinchazos de 250  $\mu$ L por vía intramuscular. Una vez culminado el esquema de inmunización se realizó la colección individual del suero de cada animal por vía aortica y se conservó a -20 °C hasta su uso. La eficiencia y especificidad de los anticuerpos anti-FurC obtenidos se corroboró mediante Western blot con las proteínas purificadas FurC, FurA y FurB de *Anabaena* sp. PCC7120.

### **3.10.2. Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa y detección inmunológica de proteínas (Western-blot).**

Los ensayos de Western Blot se realizaron para la detección de la proteína D1 y de FurC. Las muestras para analizar procedieron de dos replicas biológicas de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC recogidas en fase exponencial de crecimiento (D.O. a 750 nm = 0,7-0,9). En el caso de la inmunodetección de D1, los extractos crudos de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC se prepararon como se indica en el apartado 3.11.2 y se cuantificaron mediante BCA (apartado 3.11.3). A continuación 30  $\mu$ g de proteína total se cargaron en un gel SDS-PAGE al 17 %. En el caso de la inmunodetección de FurC se mezclaron 80  $\mu$ L de cada cultivo de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC con 20  $\mu$ L de SB5X y se hirvió la muestra durante 5 min 95 °C. A continuación, los extractos se centrifugaron durante 30 min a 16500 x g y se cargaron 20  $\mu$ L del sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 17 %.

Una vez finalizada la electroforesis en ambos casos, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), aplicando un voltaje de 15 V durante 60 min con un dispositivo Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y una fuente de corriente PowerPac 300 (Bio-Rad). Antes de la transferencia, se activó la membrana de PVDF con metanol durante 10 s y posteriormente se sumergió en tampón de transferencia (Tris-HCl 48 mM pH 9,2, glicina 39 mM, SDS 0,4 % (p/v) y metanol 20 %) durante 2 min. A su vez, se sumergieron el gel y los papeles de filtro en tampón de transferencia durante 2 min. El montaje final se realizó en el siguiente orden: Papel de filtro + membrana + gel + papel de filtro y se procedió con la transferencia. Una vez finalizada, la membrana se bloqueó a temperatura ambiente durante al menos 3 h u O/N con leche desnatada al 4 % (p/v) en tampón TBS - T (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween-20 0,1 %). Tras efectuar 3 lavados de 5 min con TBS-T, se incubó durante una h con los anticuerpos primarios adecuados. Concretamente para la inmunodetección de D1 se utilizó un anticuerpo policlonal de pollo anti-D1 comercial (Agrisera) a una dilución 1:4000 en TBS-T y para la inmunodetección de FurC, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-FurC generado en este trabajo (apartado 3.10.1) a una dilución 1:1000 en TBS-T. Tras lavar de nuevo

con TBS-T, se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario necesario para caso conjugado con peroxidasa utilizando una dilución 1:10000 en TBS-T. A continuación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se procedió al revelado mediante quimioluminiscencia en el sistema Bio-Rad Chemidoc™ imaging system.

### **3.11. Métodos analíticos para el estudio fenotípico de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC**

#### **3.11.1. Análisis del crecimiento y determinación de la tasa de duplicación**

Para evaluar la velocidad del crecimiento fotoautotrófico de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe EB2770FurC, se realizaron cultivos con 3 réplicas biológicas de cada cepa en paralelo y se registró cada día durante 20 días, tanto el número de células con un cámara de Neubauer como la densidad óptica D.O. a 750 nm del cultivo. En cada fase de crecimiento se utilizó una dilución apropiada para el correcto contaje de células y la medición espectrofotométrica. A partir de los valores obtenidos de la D.O. a 750 nm se calculó la tasa de duplicación ( $\tau$ ) como se describe previamente (Stein 1973).

##### **3.11.1.1. Contaje celular**

Para la medición del crecimiento y la normalización de los resultados de determinadas técnicas se utilizó el parámetro “número de células” como medición alternativa del crecimiento a la proteína total, clorofila *a* o volumen celular empaquetado VCE comúnmente utilizados. Esta decisión se basó en que como se verá más adelante, la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC presentaba diferencias significativas en su contenido en pigmentos, tamaño celular o proteína total. Por lo tanto, se consideró más adecuado normalizar frente a número de células, ya que este es independiente de esas variables. El contaje de las células presentes en los filamentos de *Anabaena* sp. PCC7120 se realizó en una cámara de Neubauer. Tras realizar la dilución adecuada para el procedimiento, las células se contaron en cada uno de los 4 cuadrantes de mayor tamaño. Finalmente se calculó la media de células en 1 cuadrante y la densidad celular por mililitro se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

Concentración (células / mL) = Media de células contadas en un cuadrante ·  $1 \times 10^4$  · factor de dilución.

### **3.11.2. Obtención de extractos proteicos solubles de *Anabaena* sp. PCC7120**

Los extractos proteicos solubles de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe EB2770FurC se utilizaron para diferentes análisis durante este trabajo. Para la obtención de estos se recogían entre 5-10 mL de cada cultivo en tubo Falcon a 3080 x *g* y 4 °C durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el volumen restante y se pasaron a tubos Eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 16500 x *g* y 4 °C durante 5 min. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 0,5-1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 y se añadió inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Las células se sonicaron con 5 ciclos de 45 s (intermitentes cada 0,5 s con amplitud del 85 %) y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Finalmente, la suspensión de células rotas se centrifugó a 16500 x *g* durante 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf para su análisis o para su conservación a -20 °C hasta su uso en los próximos días. La cantidad de proteínas totales en cada extracto se calculó mediante el método de BCA, como se describe en el apartado 3.11.3.

### **3.11.3. Cuantificación de proteína total en extractos proteicos.**

La determinación de proteína total se utilizó en extractos crudos y en muestras de exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC. Para ello se utilizó el método del ácido bicinconínico, empleando el BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la capacidad que tiene el enlace peptídico de reducir los iones  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino. Posteriormente el  $\text{Cu}^+$  se une al BCA, cambiando su estructura y haciendo que absorba a 562 nm. De tal manera, que la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente, la cual se puede calcular interpolando la absorbancia obtenida en la recta de calibrado del método realizada con BSA.

### **3.11.4. Análisis del contenido en pigmentos fotosintéticos.**

Para todas las medidas del contenido en pigmentos se utilizó un espectrofotómetro de doble haz SPECORD® 250 PLUS (Analytik Jena) o Cary 100 Bio y cubetas de plástico.

#### **3.11.4.1. Espectros de absorción de células enteras de *Anabaena* sp PCC7120**

Para la realización de espectros de absorción de células enteras se midió la absorbancia entre 550 y 800 nm de 1 mL de cultivo. Posteriormente los espectros se normalizaron a 750 nm y se registraron los valores de absorbancia a 635 nm y 680 nm para calcular la ratio entre la ficocianina y la clorofila *a*.

### 3.11.4.2. Determinación del contenido de clorofila *a*

El contenido de clorofila *a* de los cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120 se determinó espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney 1941). Las células de 1 mL de cultivo se recogieron por centrifugación, y tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de metanol y se agitó con vórtex durante 1 min en oscuridad. La suspensión resultante se centrifugó a 16500 x *g* durante 2 min. La concentración de clorofila *a* en el sobrenadante se estimó en base a su absorbancia a 665 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar para la clorofila *a*  $\epsilon=74,46 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron normalizados a número de células.

### 3.11.4.3. Determinación de ficobiliproteínas

El contenido de ficobiliproteínas en cultivos se calculó mediante el método descrito por Glazer et., al en 1976 (Bryant, Glazer, and Eiserling 1976) en base a su absorbancia a 620 nm en los extractos de proteínas solubles obtenidos como se describe en el apartado 3.11.2. La concentración se estimó utilizando el coeficiente de extinción molar para las ficobiliproteínas  $=7,41 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron normalizados a número de células.

### 3.11.4.4. Determinación de carotenoides

La determinación de carotenoides se realizó según el método descrito por Davies et., al en 1976 (Davies 1976). Se recogieron las células de 5 mL de cultivo en un tubo Falcon a 3080 x *g* y 4 °C durante 5 min. Tras descartar el sobrenadante estas se resuspendieron en el volumen restante y se traspasaron a un tubo Eppendorf. Los tubos se centrifugaron a 16500 x *g* y 4 °C durante 5 min y se descartó el sobrenadante en la mayoría de lo posible. Las células se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y se sonicaron con 5 ciclos de 45 s y pausas de 30 s, con una amplitud del 80 % y 0,5. La suspensión de células rotas se traspasó a un tubo Falcon y se añadieron 4 vol. de acetona para realizar la extracción de los carotenoides. Esta mezcla se centrifugó a 3080 x *g* y 4 °C durante 5 min. Para estimar la concentración de carotenoides se registró la absorbancia del sobrenadante a tres longitudes de onda 480 nm, 465 nm y 663 nm usando como referencia una solución de acetona y se aplicó la siguiente formula.

$$Abs_{carotenoides} = Abs_{480 \text{ nm}} + 0,144 \cdot Abs_{620 \text{ nm}} - 0,683 \cdot Abs_{465 \text{ nm}}$$

$$Concentración \text{ de carotenoides } \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs_{carotenoides}}{\epsilon \cdot l} \quad \text{donde } \epsilon = 250 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Los resultados se expresaron normalizados a número de células.

### 3.11.5. Determinación de la tasa de consumo y liberación de O<sub>2</sub>

La determinación de la tasa fotosintética neta (balance de oxígeno generado por la fotosíntesis real menos el consumido por la fotorrespiración y la respiración oxidativa (Barnes 2015)) y la tasa respiratoria de las cepas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo mediante la medida de la producción y consumo de oxígeno a lo largo del tiempo con un electrodo de oxígeno tipo Clark. Se utilizó el dispositivo “ChloroLab 2 System”, que contiene un electrodo de oxígeno “Oxytherm” (Hansatech) con un cátodo de platino y un ánodo de Ag-AgCl recubierto de una cámara de reacción termostatazada. Para el montaje y calibrado del electrodo se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante.

Brevemente, la calibración consta de dos partes: calibración de la luz y calibración de la medida de concentración de oxígeno. La calibración de la luz se realizó siguiendo los pasos indicados por el software O<sub>2</sub>view proporcionado por el fabricante, aportando los datos suministrados por un fotosensor proporcionado por el fabricante. Para la calibración de la medida, se fijó como concentración máxima de oxígeno una disolución de agua destilada agitada durante al menos 30 min y como concentración mínima una disolución de ditionito de sodio, que reacciona consumiendo el oxígeno ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$ ). Ambas disoluciones se introdujeron en el electrodo y se siguieron paso a paso las instrucciones del software O<sub>2</sub>view hasta finalizar la calibración.

Una vez calibrado el equipo, las medidas se realizaron introduciendo en la cámara 1 mL de cultivo a temperatura ambiente y agitación del 65 %, asegurando así una dilución homogénea sin alterar la integridad de los filamentos. Para medir la tasa de respiración, las medidas se llevaron a cabo en oscuridad cubriendo completamente la cámara con papel de aluminio y registrando los valores cada segundo durante 5 min. Para medir la tasa neta de fotosíntesis, la cámara se iluminó a una intensidad de luz de saturación a  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  cubriendo también la cámara con papel de aluminio, minimizando la entrada de luz externa y se registraron los valores cada segundo durante 3 min de medición. Los datos se procesaron utilizando el software O<sub>2</sub>View y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol O}_2 / \text{número de células} \cdot \text{min}$ .

### 3.11.6. Análisis de la tolerancia a estrés oxidativo

Con el objetivo de analizar la respuesta frente a estrés oxidativo de las cepas *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC. A partir de cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía, se preparó una placa de 96 pocillos con 200  $\mu\text{L}$  de cultivo ajustados a una D.O. a 750 nm de

aproximadamente 0,4 de ambas cepas con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 0,5, 1, 3, 7 y 10 mM) y metil viológeno (1, 2,5, 5, 7,5 y 10 mM). Las placas fueron preparadas en esterilidad, cubiertas con parafilm para evitar la evaporación y con papel de aluminio para evitar el efecto de la luz del ambiente. Dichas placas se mantuvieron en agitación a 90 rpm y a temperatura ambiente. La cuantificación de la supervivencia se realizó midiendo la Abs 650 nm con un espectrofotómetro adaptado para placas de 96 pocillos (Multiskan EX hermoFisher) tras la previa resuspensión de los cultivos.

### 3.11.7. Análisis de actividades enzimáticas

#### 3.11.7.1. Determinación de la actividad catalasa

La determinación de la actividad catalasa se realizó siguiendo un método adaptado de los protocolos previamente descritos (Gonzalez et al., 2010, Beers & Sizer, 1952). El procedimiento para obtener el extracto proteico y su cuantificación se realizó como se describe en el apartado 3.11.2, con la excepción de que el tampón de resuspensión utilizado fue tampón fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 50 mM pH 7 y se cuantificó la proteína total por BCA (apartado 3.11.3). Una vez cuantificada la cantidad de proteína en el extracto, se tomó el volumen correspondiente a 350 µg de proteína y se introdujeron en una cubeta de cuarzo, a la cual se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta alcanzar la concentración final de 20 mM. Rápidamente, la disociación del peróxido de hidrógeno se monitorizó espectrofotométricamente a 240 nm a intervalos de 1 segundo durante 5 min con un espectrofotómetro (Specord® 250 Plus). Como blanco se empleó la misma cantidad de extracto proteico, completando con el mismo volumen de agua destilada en lugar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad de la enzima catalasa se calculó como:

$$\frac{U}{\text{número de células}} = \frac{\frac{\Delta Abs_{240}}{\text{min}} \cdot 1000}{\text{número de células}}$$

En donde se define 1U como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min. Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian).

#### 3.11.7.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó siguiendo un protocolo que incluye algunas modificaciones del método ya descrito (Lai et al., 2008, Winterbourn et al., 1975, Gonzalez et al., 2010) y que se describe a continuación

1. Se obtiene el extracto crudo de *Anabaena* sp. PCC7120 o EB2770FurC como se indica en el apartado 3.11.2 y se cuantifica la concentración de proteína total mediante el BCA (apartado 3.11.3).
2. En cubetas de plástico de espectrofotómetro se preparan las siguientes mezclas de reacción:

Cubeta	Extracto celular	Tampón fosfato 67 mM pH 7,8	EDTA 100 mM (conc. final 6,4 mM)	NBT 1,2 mM (conc. final 41 µM)
Blanco (x2)	-	900 µL	65 µL	35 µL
Control negativo	-	900 µL	65 µL	35 µL
Muestra	600 µg	Completar hasta 1 mL	65 µL	35 µL

3. Una vez preparadas, se añaden la riboflavina y TEMED a las cubetas que corresponde y se homogeneiza bien.

Cubeta	Riboflavina 0,12 mM (conc. final 2,3 µM)	TEMED (dil 1/1000) (conc. final 23,5 µM)	Tampón fosfato 67 mM pH 7,8
Blanco (x2)	-		23,6 µL
Control negativo	20 µL	3,6 µL	
Muestra	20 µL	3,6 µL	

4. Se hace el blanco y se mide la absorbancia a 560 nm de todas las cubetas.
5. Se iluminan las cubetas durante 10 min con luz UV (a excepción del blanco)
6. Pasado ese tiempo, se mide de nuevo la absorbancia a 560 nm.
7. Con los datos obtenidos, se determina la  $\Delta Abs_{560}/min$  en el control negativo, fijándose como la variación máxima, puesto que carece de SOD, y el de las muestras.

El porcentaje de inhibición de la SOD se calcula como

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right) \text{ control negativo} - \left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right) \text{ muestra}}{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right) \text{ control negativo}}$$

1 U de enzima se define como la cantidad de enzima que provoca una inhibición del 50 % y se calcula como:

$$U = \frac{\% \text{ inhibición}}{50}$$

Dividiendo las U entre millón de células correspondiente a los  $\mu\text{g}$  de proteína ensayados en la reacción se obtiene la actividad Superóxido dismutasa expresada como U/ número de células. Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian).

### **3.11.7.3. Detección de la actividad superóxido dismutasa (MnSOD y FeSOD) mediante tinción en gel de poliacrilamida no desnaturalizante.**

El protocolo de visualización de la actividad de MnSOD y FeSOD por separado fue adaptado del procedimiento descrito en (Yingping et al., 2014). Se tomaron 15 mL de cultivo de los cuales se obtuvo el extracto proteico resuspendido en tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 67 mM pH 7,8 y se cuantificó como se describe en los apartados 3.11.2 y 3.11.3. Tras la cuantificación de la proteína total se tomó el volumen correspondiente con 30  $\mu\text{g}$  de proteína, se mezcló con 3  $\mu\text{L}$  de tampón carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, 30 % glicerol y azul de bromofenol 0,25 % (m/v)) y sin hervir la muestra, esta se cargó en un gel nativo al 8 % de acrilamida (apartado 3.9). La electroforesis transcurrió a 90 V durante 2h. Para el revelado, los geles se aclararon con agua tras la electroforesis y se incubaron en oscuridad con 25 mL de una disolución de NBT 2,5 mM durante 30 min seguida la incubación con una disolución de TEMED 28  $\mu\text{M}$  y 28  $\mu\text{M}$  de riboflavina durante 20 min. La tinción se completó mediante la exposición de los geles a la luz del ambiente.

## **3.12. Obtención y análisis del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC.**

Para los estudios del exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120 y la cepa EB2770FurC se colaboró con el Prof. Dr. Ignacio Luque del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC, Sevilla), donde se llevaron a cabo parte de los experimentos realizados durante la estancia realizada en su laboratorio. El análisis del exometaboloma se realizó en colaboración con el Prof. Dr. Richard Helm de Virginia Tech, en Virginia, Estados Unidos.

La metodología utilizada para el aislamiento del exoproteoma y exometaboloma se puso a punto inicialmente siguiendo un protocolo basado en el previamente descrito por (Oliveira et al., 2015). Sin embargo, en base a los problemas encontrados con la viscosidad de algunas

muestras (ver más adelante (apartado 4.5.1)), se puso a punto otra metodología para la obtención del exoproteoma adaptada del protocolo descrito en (Vilhauer et al., 2014). A continuación, se describen el procedimiento detallado para la obtención y análisis del exoproteoma.

### **3.12.1. Consideraciones previas**

Como la muestra obtenida iba a ser utilizada tanto para la determinación del exoproteoma como del exometaboloma, inicialmente fue necesario tomar una serie de precauciones con el material de vidrio y plástico para reducir la contaminación del material por PEGs que pudiera apantallar la determinación de los metabolitos presentes en la muestra.

Los Erlenmeyer se aclararon abundantemente con agua MQ y se esterilizaron envueltos en papel de plata e incluidos en bolsas de autoclave. Todo el material de plástico, excepto las puntas, se aclaró dos veces con metanol al 40 % en agua MQ, se secó en estufa a 60 °C y se esterilizó por exposición a luz UV durante 30 min en la campana de flujo laminar. Los filtros se aclararon filtrando 30-40 mL de metanol al 40 % en agua MQ y se dejaron secar en una campana de flujo laminar.

### **3.12.2. Puesta a punto de los cultivos para el análisis del exoproteoma y exometaboloma**

Se iniciaron cultivos desde colonia inoculando 20-40 mL de BG11 con las células de cada estirpe colectadas de placa mediante asa de siembra. Estos preinóculos crecieron hasta una D.O. a 750 nm de entre 1,5-2 a 28-30 °C, mediante agitación orbital a 130 rpm y una iluminación constante de 25  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Una vez alcanzada la D.O. deseada, los precultivos se centrifugaron suavemente a temperatura ambiente para retirar el medio de cultivo.

A partir de estas células se comenzaron los cultivos para la recogida del medio extracelular en frascos Erlenmeyer con 80 mL de cultivo ajustados a una densidad óptica 750 nm de 0,15. El crecimiento se realizó a 28 °C con un régimen constante de luz blanca entre 25-30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mediante agitación orbital continua a 120 rpm en un incubador orbital Innova 43 R. Los cultivos crecieron durante 12 días hasta alcanzar la fase exponencial tardía de cultivo con una D.O. entre 1-1,5, momento en el que se recogieron para su posterior procesamiento.

### 3.12.3. Aislamiento y procesamiento del exoproteoma y exometaboloma

A partir de los cultivos recogidos, se eliminaron las células mediante filtrado por 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y a continuación, se realizó un segundo paso de filtrado por 0,22  $\mu\text{m}$ . A partir de este punto se guardaron 10 mL de la muestra obtenida para la determinación del exometaboloma. Esta muestra se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un tubo Falcon de 15 mL de capacidad, se liofilizó y se envió al laboratorio del Prof. Dr. Richard Helm para su análisis mediante LC-MS.

El resto de la muestra filtrada se utilizó para la determinación del exoproteoma. Esta se traspasó a dos tubos Falcon de 50 mL de capacidad, se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó. Posteriormente, la muestra liofilizada se resuspendió en 2 mL del tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl preparado con  $\frac{1}{2}$  de pastilla de cóctel de proteasas cOMplete™ (Roche) por cada 3 litros y se dializó frente al mismo tampón mediante dos cambios O/N a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (apartado 3.6.1). Una vez finalizada la diálisis, la muestra se sacó de la membrana y se dispuso en Falcon de 15 mL de capacidad, se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó de nuevo. Las muestras liofilizadas se facilitaron al Servicio de proteómica del Instituto del IBVF de Sevilla para su análisis por espectrometría de masas SWATH (apartado 3.13.3.2), donde se realizó la identificación y cuantificación relativa de la abundancia de proteínas en las diferentes muestras.

## 3.13. Técnicas espectroscópicas

### 3.13.1. ICP-OES

ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*) es una técnica de espectroscopía atómica que permite el análisis elemental de la mayoría de los elementos de la tabla periódica con gran sensibilidad, pues su límite de detección en muestras líquidas es de 0,01 ppm. La técnica hace uso de las señales fotofísicas únicas de cada elemento para detectar con éxito el tipo y cantidad relativa de cada elemento dentro de la complejidad de un compuesto.

En este trabajo se utilizó para determinar la presencia de metales en la proteína FurC. Las muestras de proteína se disolvieron en una solución de ácido nítrico al 5 % (Aristar®) en un volumen final de 10 mL en tubos Falcon de 15 mL y se analizaron en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia.

### 3.13.2. Espectrometría de fluorescencia a 77 Kelvin

El espectro de emisión de fluorescencia a temperatura del nitrógeno líquido (77 K) realizado en microorganismos fotosintéticos como la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 proporciona información importante sobre la organización y el estado de la maquinaria fotosintética. Los espectros de emisión de fluorescencia a 77 K se realizaron en colaboración con Prof. Dr. Rafael Cases del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad de Zaragoza. Las muestras se introdujeron en tubos de cuarzo de EPR, dentro del cual se congelaron en nitrógeno líquido (77 K). Para la medida, las muestras congeladas se excitaron con una lámpara halógena de tungsteno de 1000W ORIEL 66187 y un monocromador doble de 0,22 m SPEX 1680B. Las muestras utilizadas consistieron en cultivos recogidos en la fase exponencial de crecimiento a una concentración de clorofila de aproximadamente 10 mg/mL. La excitación se realizó a dos longitudes de onda diferentes, a 440 nm para monitorizar la transferencia de energía entre los fotosistemas a la Chl *a* o a 580 nm para analizar la transferencia de energía desde los ficobilisomas a la Chl *a*. Los espectros se normalizaron a una concentración idéntica de Chl *a* y de ficobiliproteínas, respectivamente. La emisión de fluorescencia se detectó con un monocromador de 0,5 m JARREL-ASH con un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928. Todas las medidas fueron corregidas de la respuesta del sistema. Los anchos de línea espectral (FWHM) para la excitación y la emisión fueron de 3,6 y 1,7 nm, respectivamente.

### 3.13.3. Espectrometría de masas

#### 3.13.3.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF MS)

El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization y TOF (Time-Of-Flight) por el detector de iones que se acopla al MALDI. En este trabajo se utilizó esta técnica para el análisis del peso molecular de FurC recombinante purificada bajo diferentes condiciones de incubación. Las muestras de proteína a una concentración aproximada de 40  $\mu$ M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM se procesaron y se analizaron en el Servicio de Proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en un equipo 4800 plus MALDI-TOF/TOF (Sciex), en modo lineal utilizando un rango de masa de entre 5000–35000 Da, y un focus en 14500 Da.

### 3.13.3.2. Espectrometría de masas SWATH (SWATH-MS).

La identificación y cuantificación relativa de proteínas a partir de las muestras de exoproteoma se realizó mediante la técnica de espectrometría de masas SWATH (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment ion spectra*). La técnica SWATH se engloba dentro de los métodos de espectrometría de masas (mass spectrometry, MS) con adquisición independiente de datos (data-independent acquisition, DIA), que han mostrado ser una alternativa para superar las limitaciones de los métodos MS de adquisición dependiente de datos (data-dependent acquisition, DDA). En DIA, se adquieren los espectros de masas en tándem (MS/MS) resultantes de la fragmentación simultánea de todos los péptidos dentro de un rango de masas, sin una pre-selección de los iones precursores que se van a fragmentar (Gillet et al, 2012). Esto permite identificar un mayor número de proteínas, ofreciendo además una cuantificación relativa de la abundancia de cada proteína en las diferentes muestras.

La muestra de exoproteoma liofilizada se facilitó al Servicio de proteómica del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC, Sevilla) para su procesamiento y análisis por SWATH-MS. El flujo de trabajo de SWATH implica un primer paso para la generación de una librería espectral que es necesaria para identificar los péptidos adquiridos en las ejecuciones de SWATH-MS. La librería espectral fue generada con LC MS/MS convencional, utilizando el conjunto de muestras de exoproteoma a analizar por SWATH.

## 3.14. Técnicas de microscopía

A lo largo de este trabajo se emplearon técnicas de microscopía para analizar la morfología, presencia de heterocistos, fluorescencia intrínseca y ultraestructura de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC.

### 3.14.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

La morfología, presencia de heterocistos y fluorescencia intrínseca de las células se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-fluorescence acoplado con una cámara Nikon DXM 1200F disponible en nuestro departamento o con un microscopio invertido Olympus IX81 acoplado a una cámara CCD (Model XC50; Olympus) en el servicio de Microscopía e Imagen del IACS-IIS Aragón. Para la toma de imágenes con el microscopio invertido, se inmovilizaron las células de 40  $\mu$ L de cultivo en una placa Petri con BG11 o BG11<sub>0</sub> agar 1 %. Una vez seco, se

cortaron pequeños cubos que se colocaron en un portaobjetos invertido. Las imágenes se procesaron con los softwares ImageJ y Adobe Photoshop CC 2017.

#### **3.14.1.1. Tinción de proheterocistos y heterocistos con azul Alcian**

El azul Alcian (Alcian Blue 8GX, Sigma Aldrich) tiñe los polisacáridos de la envuelta de los proheterocistos y heterocistos (Mckinney, 1953). Para visualizarlos en el microscopio óptico, la muestra se preparaba mezclando en proporción 5:1 (v/v) la suspensión de las cianobacterias y una disolución previamente filtrada por 0,45  $\mu\text{m}$  de azul Alcian al 1 % en (p/v).

#### **3.14.2. Microscopía electrónica**

La ultraestructura de los filamentos de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe EB2770FurC se analizó por microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido. Para ello se recogieron los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y se fijaron y procesaron con diferentes métodos según la técnica utilizada.

##### **3.14.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las imágenes se tomaron con un microscopio JEOL JSM 6360-LV. Las muestras de células se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % (Polysciences) en tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  66 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  66 mM, pH 6,8) durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón fosfato y fijaron las células 2 %  $\text{OsO}_4$  durante 1 h. Finalmente, las muestras se procesaron y visualizaron en el Servicio de Microscopía de Sistemas Biológicos de la Facultad de Medicina en la Universidad de Zaragoza.

##### **3.14.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se recogieron las células de 2 mL de cultivo en un Eppendorf y se lavaron 3 veces con 2 mL de tampón Sorensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,2) centrifugando 10 min a 10000 x g en cada ocasión. Tras el último lavado, se añadió a las células una solución de agar a 40-50 °C preparada en el mismo tampón hasta cubrir el precipitado. Las muestras se homogenizaron bien con el agar (manteniendo un precipitado visible) y se dejaron enfriar. Una vez gelificó el agar, este se sacó del Eppendorf y se cortó en cubos de aproximadamente 1 mm de tamaño de arista. Los cubos se introdujeron en otro tubo Eppendorf para fijarlos por inmersión con 500  $\mu\text{L}$  de tampón Sorensen con 3,1 % glutaraldehído. Finalmente, las muestras fueron procesadas y examinadas con un microscopio JEOL JEM1010 (100 kV) por el Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 3.15. Análisis bioinformáticos

#### 3.15.1. Modelado de la estructura tridimensional de FurC

Para la predicción de la estructura tridimensional de FurC en forma de dímero y tetramero se contó con la colaboración de la Prof. Dra Marta Martínez Júlvez. El modelado se realizó utilizando las herramientas AlphaFold y SWISS-MODEL.

Para predicciones realizadas con AlphaFold se utilizó el servidor AlphaFold Colab (Varadi et al., 2022, Jumper et al., 2021) que predice la estructura de proteínas desde la secuencia de aminoácidos sin utilizar estructuras homólogas como plantillas. La fiabilidad de las predicciones de AlphaFold se evaluó mediante el índice de confianza para cada modelo (*pLDDT*, *predicted Local Distance Difference Test*).

Para el modelado por homología se utilizó el servidor SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>). La librería de SWISS-MODEL Workspace utiliza tanto BLAST (Camacho et al., 2009) como HHblits (Steinegger et al., 2019) como buscadores; para identificar las plantillas y obtener los alineamientos entre la proteína a modelar y su plantilla. El uso combinado de estos dos métodos garantiza un correcto alineamiento, incluso cuando no hay alta identidad de secuencia entre el modelo y su plantilla. De las plantillas obtenidas se seleccionaron para el modelado las correspondientes a proteínas PerR. La evaluación de la calidad de los modelos construidos se llevó a cabo en términos de la función de puntuación QMEAN (Studer et al., 2020). El servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007) se utilizó para analizar los posibles estados oligoméricos de PerR de *B. subtilis* consistentes con su estructura cristalográfica (PDB: 3F8N)

Las estructuras cristalográficas experimentales se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank (Berman et al., 2000). La visualización de los modelos generados se realizó con el software PyMOL (v. 2.0 Schrödinger, LLC) que permite analizar varias proteínas al mismo tiempo y con lo que es posible superponer estructuras proteicas para deducir los alineamientos estructurales, comparar los sitios de unión a metal y medir distancias entre átomos.

#### 3.15.2. Identificación de la secuencia consenso de unión al DNA de FurC.

La secuencia consenso de unión al DNA de FurC o caja de FurC se identificó utilizando la herramienta MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*) (Bailey et al., 2006) disponible en el servidor online (<http://meme-suite.org/tools/meme>). Esta herramienta sirve para identificar

automáticamente uno o más motivos conservados en un conjunto de secuencias de DNA o de proteínas. En nuestro caso se utilizó como “input” las secuencias en formato FASTA de las regiones promotoras a las cuales FurC había mostrado unión en ensayos de EMSA (Resultados, apartado 4.4.1.1). Esta búsqueda de MEME se realizó utilizando el Modelo ZOOPS, que busca una o cero ocurrencias de motivos por secuencia y solicitando un motivo con una longitud de entre 15 y 19 pb. Los demás parámetros se aplicaron en modo predeterminado. Una vez obtenida la caja FurC, esta se comparó con otros motivos de factores transcripcionales conocidos utilizando la herramienta TomTom (Gupta et al., 2007) disponible también en el servidor de MEME-suite (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>), utilizando los parámetros predeterminados.

### **3.15.3. Predicción de sitios de unión de FurC en las regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120**

Con el objetivo de predecir nuevos sitios de unión de FurC en las regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 se utilizó el software FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) disponible en MEME-suite (<http://meme-suite.org/tools/fimo>). FIMO ofrece la posibilidad de escanear un motivo consenso (matriz de probabilidades) hallado previamente, en un grupo de secuencias de interés suministradas al programa. Las secuencias de interés en este caso correspondieron con las posibles regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Estas se extrajeron manualmente desde la base de datos RSAT (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/>) seleccionando secuencias de hasta -1000 pb upstream y +50 downstream, utilizando la opción “noorf” que restringe la región upstream solo a regiones intergénicas, cortando automáticamente las secuencias para evitar solapamientos con la región codificante del gen anterior. Estas secuencias se escanearon con una versión más restrictiva de la matriz de predicción de FurC, la cual se generó con el software MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>), utilizando las 6 secuencias de unión de FurC más conservadas que se encuentran en las regiones promotoras de los genes *prxA*, *srxA*, *ftsH*, *furC*, *ahpC* y *nifH2* (apartado 4.4.1.1, Tabla 12) y los parámetros predeterminados. Los resultados obtenidos por FIMO se filtraron por un punto de corte de un *p value*  $<1 \times 10^{-5}$ . Los resultados fueron post-procesados manualmente para descartar motivos encontrados en regiones codificantes mal anotadas o en regiones promotoras de pseudogenes.

### **3.15.4. Bases de datos para el análisis de secuencia y otras herramientas bioinformáticas utilizadas.**

A continuación, se recogen algunas de las herramientas y bases de datos utilizadas:

-KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) y CYANOBASE (<http://genome.microbedb.jp>): Para la anotación específica de genes y proteínas de cianobacterias y obtención de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

-BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés para la búsqueda de proteínas homólogas en la base de datos del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

-CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>): Para el alineamiento de las secuencias de proteínas.

-PROTPARAM (<https://web.expasy.org/protparam/>): Herramienta del servidor ExPASy (servidor del Instituto de Bioinformática de Suiza) utilizada para la predicción del punto isoeléctrico y del coeficiente de extinción de proteínas en base a su secuencia de aminoácidos.

-TM Calculator (Thermofisher): Para el diseño de oligonucleótidos para PCR convencional. Herramienta disponible en (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific.html>).

-Primer Express <sup>™</sup> (Applied Biosystems): Esta herramienta se utilizó para el diseño de oligonucleótidos para PCR a tiempo real.

-TOMTOM (<https://meme-suite.org/meme/doc/tomtom.html>): Herramienta incluida dentro de MEME Suite utilizada para comparar la caja-FurC obtenida por MEME con otras cajas descritas de otros reguladores transcripcionales de bacterias disponibles en la base de datos "CollectTF".

-STRING (<https://string-db.org/>): Base de datos y servidor online para la construcción de redes de interacción física o funcionales entre proteínas.

-Cytoscape (versión 3.9.0): Programa para el análisis y visualización de redes de interacción proteína-proteína además de integrar visualmente la red con perfiles de expresión, fenotipos y vincular la red a bases de datos públicas.

-Microbes Online: (<http://www.microbesonline.org>): Esta web se utilizó para consultar la predicción de genes que forman operones en *Anabaena* sp. PCC7120

# Resultados

**Capítulo I. Caracterización bioquímica y estructural de la proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.**



## 4. Resultados

### 4.1. Capítulo I | Caracterización bioquímica y estructural de la proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.

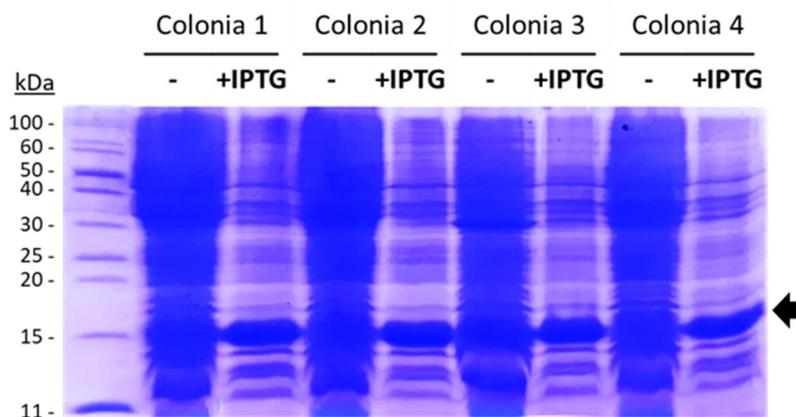
Estudios previos propusieron que FurC correspondía al regulador PerR en *Anabaena* sp. PCC7120 (Yingping et al., 2014). Estos autores demostraron la inactivación de FurC por peróxido en presencia de hierro, sugiriendo que dicha inactivación podría ocurrir mediante oxidación catalizada por metal. Sin embargo, se desconocían otras características bioquímicas y estructurales fundamentales que aporten luz sobre la funcionalidad de la proteína. Este capítulo se centrará en describir los resultados de la caracterización bioquímica y estructural de FurC, desde la puesta a punto de su purificación hasta el modelado de su estructura tridimensional y ensayos de cristalización.

#### 4.1.1. Sobreexpresión y purificación de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se había intentado purificar FurC recombinante sin resultados satisfactorios, ya que no se logró obtener una proteína con capacidad de unión al DNA (Hernandez et al., 2004a). Por ello, el primer objetivo de este apartado fue la puesta a punto de un proceso de purificación con el que obtener cantidad suficiente de FurC con buen nivel de actividad y pureza.

##### 4.1.1.1. Sobreexpresión de FurC recombinante

Para producir una cantidad suficiente de proteína con la que llevar a cabo su caracterización estructural y funcional es necesario conseguir previamente una elevada sobreexpresión de la misma. El protocolo que se siguió para la sobreexpresión de FurC se describe en detalle en el apartado 3.5.1.2 de Materiales y métodos. La inducción de la sobreexpresión se realizó a 15 °C con 1 mM de IPTG durante toda la noche. El resultado de la prueba de sobreexpresión se analizó mediante electroforesis desnaturizante en gel de SDS-PAGE al 17 % (Figura 16). Como se puede observar, en los extractos proteicos de los cultivos inducidos con IPTG se apreció claramente una banda mayoritaria correspondiente a FurC, con un peso molecular aproximado a su valor teórico de 17,328 Da. La inducción de la sobreexpresión también se realizó a 37 °C con 1 mM de IPTG durante 3-4 h obteniendo resultados similares.



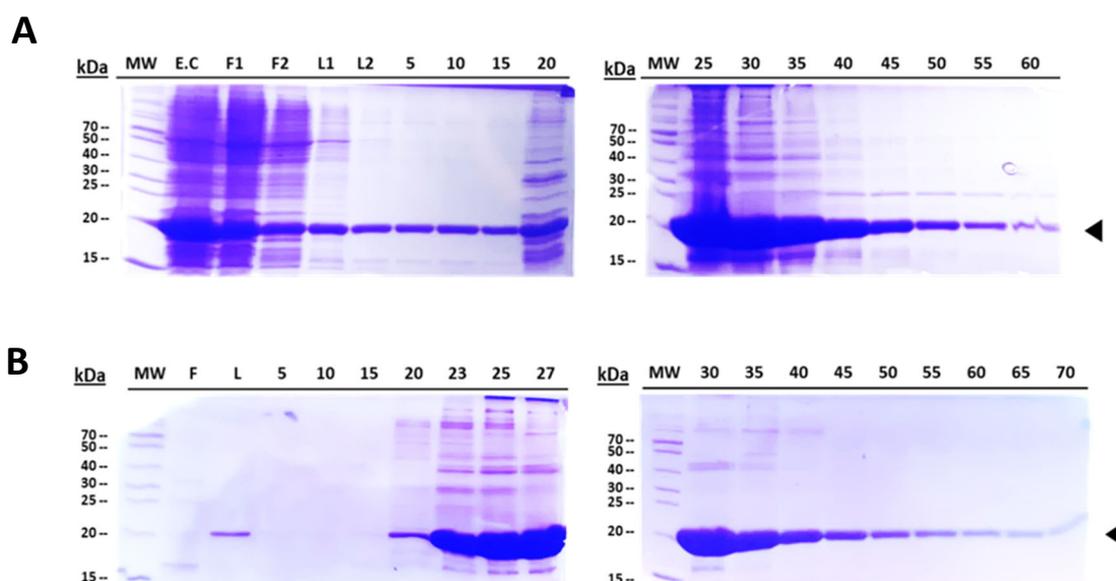
**Figura 16. Prueba de sobreexpresión de FurC en *E. coli* BL21. Gel de SDS-PAGE al 17 % teñido con azul Coomassie.** La indicación “+IPTG” está sobre los carriles con cultivo inducido. La banda correspondiente a FurC se indica con una flecha. A la izquierda del gel se indican los tamaños de los marcadores de peso molecular. Se utilizó un tampón de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### 4.1.1.2. Purificación de FurC recombinante de *Anabaena* sp. PCC7120

El buen nivel de sobreexpresión de la proteína alcanzado permitió poner a punto su purificación. Inicialmente se desarrolló un protocolo que consistió en un primer paso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en columnas con DEAE-celulosa seguida de una segunda cromatografía de unión a heparina. Posteriormente, se desarrolló un segundo método, que consistió en las mismas cromatografías, pero en orden inverso, primero la cromatografía con heparina y a continuación con DEAE-celulosa. En base al protocolo de purificación de la proteína PerR de *B. subtilis*, se añadieron 10 mM de EDTA en los tampones de purificación y equilibrado de la primera etapa cromatográfica de ambos protocolos, con objetivo de evitar el proceso de oxidación catalizada por metal.

Ambos protocolos de purificación dieron lugar a una preparación de proteína con un nivel de actividad en ensayos de EMSA y contenido en metales similares y que presentaba un mismo patrón de oligomerización. Sin embargo, el segundo protocolo se pudo optimizar en mayor medida para dar lugar a un mayor rendimiento en cuanto a cantidad de proteína. Por este motivo, con el objetivo de simplificar los resultados, a continuación, se presentan los resultados de la purificación de FurC utilizando una cromatografía de unión a heparina seguida de otra columna de DEAE-celulosa.

La purificación de FurC mediante cromatografía de heparina seguida de cromatografía por intercambio iónico en DEAE-celulosa se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.5.2.5. Brevemente, el extracto crudo obtenido tras la sonicación se cargó en una columna de heparina equilibrada en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, realizó un lavado con 3 vol. del mismo tampón y se eluyó la proteína de la columna mediante una elución isocrática con 0,3 M de NaCl. Las fracciones recogidas durante la purificación de heparina se sometieron a una electroforesis desnaturalizante para comprobar en cuales de ellas se encontraba la proteína, así como su grado de pureza (Figura 17.A). A pesar de observar la presencia de FurC en la fracción no retenida en la columna y en el lavado en ausencia de fuerza iónica, se observó que la gran mayoría de FurC estaba unida específicamente a la columna. Para no sumar heterogeneidad a la muestra, se continuó combinando únicamente las fracciones procedentes del paso de elución que contenían mayor cantidad de FurC (fracciones de la 23 a la 37= aprox. 20 mL) y se dializaron satisfactoriamente en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, sin mostrar ningún signo de precipitación.



**Figura 27. Electroforesis de las fracciones eluidas de la purificación de FurC mediante cromatografía de heparina seguida de DEAE-celulosa.** Gel SDS-PAGE 17 % teñido con azul de Coomassie tras la cromatografía de heparina (A) y de DEAE-celulosa (B). El carril (MW) contiene el patrón de pesos moleculares con las correspondencias de peso molecular en kDa a la izquierda. La banda correspondiente a FurC se indica con una flecha. E.C: Extracto crudo; F: Fracción no retenida; L: Lavado

A continuación, este *pool* se pasó por la cromatografía de DEAE-celulosa y tras 10 vol. de lavado, se utilizó un gradiente 0,1-0,7 M de NaCl para eluir la proteína de la columna. Las alícuotas recogidas de la purificación de DEAE-celulosa se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 17.B) seleccionando para la diálisis las fracciones que contenían mayor cantidad de FurC y una

absorbancia mayoritaria a 280 nm respecto a 260 nm. El esquema global de la purificación se muestra en la Figura 18.

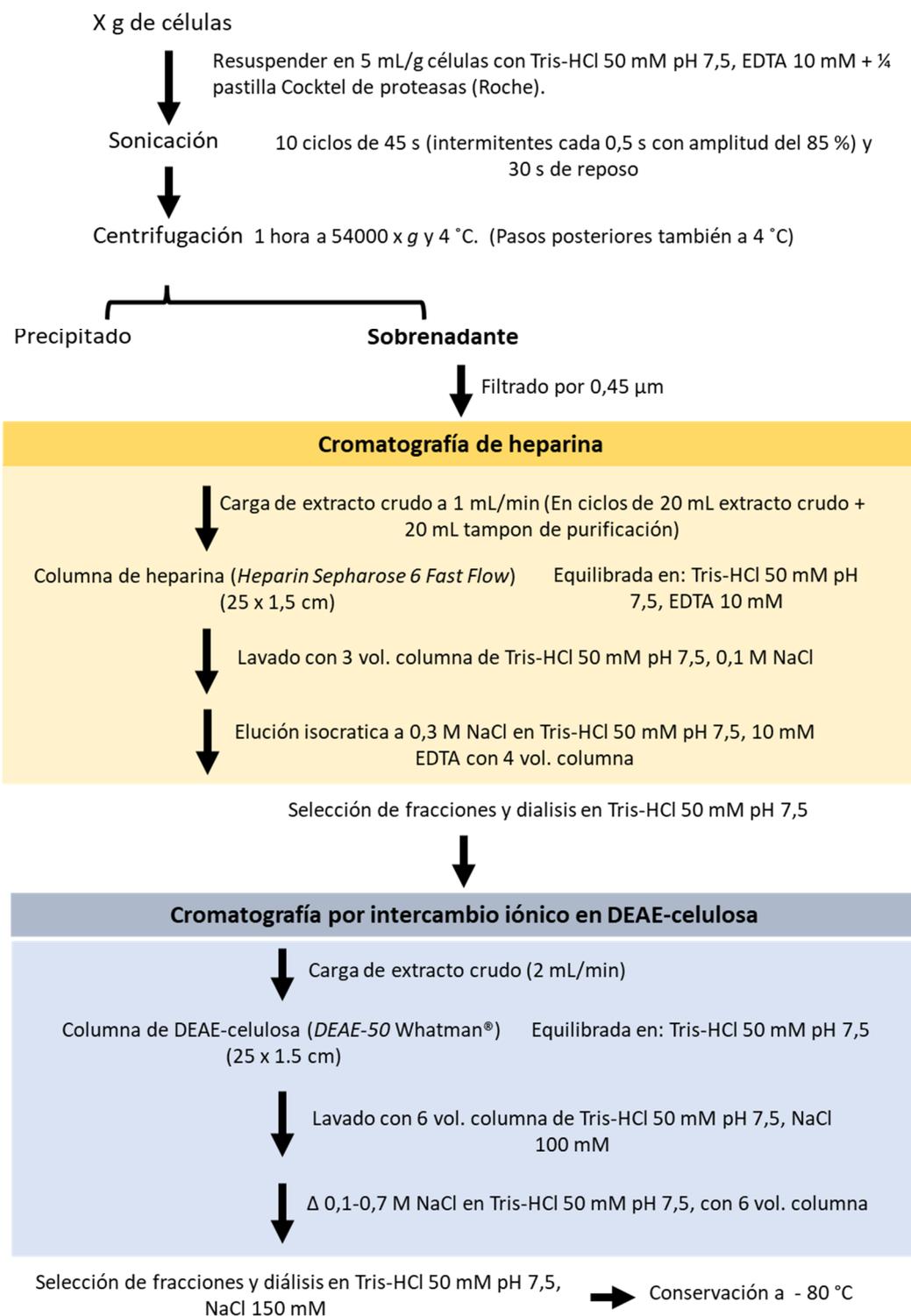
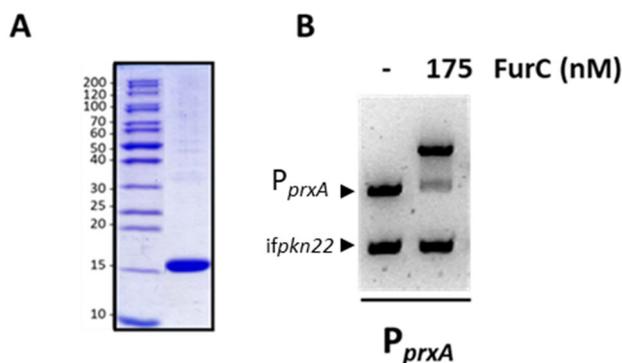


Figura 38. Esquema del protocolo de purificación de FurC mediante cromatografía en columna de unión a heparina seguida de cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.

El rendimiento total de la purificación fue de 10,5 mg de proteína purificada por g de biomasa con un grado de pureza superior al 85 %, de acuerdo con la densitometría del gel SDS-PAGE del conjunto de fracciones seleccionadas tras la diálisis (Figura 19.A).



**Figura 19. Análisis de la pureza y actividad de unión al DNA de FurC purificada mediante las columnas de heparina y DEAE-celulosa.** A) Gel SDS-PAGE 17 % de 20  $\mu$ M de FurC purificada. B) Ensayo de EMSA del promotor de *prxA* en presencia o ausencia de 150 nM de FurC. Se incluyó  $MnCl_2$  y DTT en el tampón de unión a concentración final de 100  $\mu$ M y 1 mM respectivamente y 100  $\mu$ M  $MnCl_2$  en el gel y el tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*).

Así mismo, la proteína purificada presentó buen nivel de actividad de unión al DNA, formando un complejo definido con el promotor de su diana canónica *prxA* a bajas concentraciones de proteína (175 nM) (Figura 19.B).

#### 4.1.2. Caracterización bioquímica de FurC.

##### 4.1.2.1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de FurC/PerR de *Anabaena* sp. PCC7120 con sus ortólogos PerR.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FurC con la de proteínas PerR cristalizadas hasta la fecha reveló que al contrario que la mayoría de sus ortólogos cristalizados, FurC solo mantiene una única cisteína conservada de los motivos CXXC en el extremo C-terminal (Cys103), mientras que las otras 2 cisteínas, Cys21 y Cys86, son residuos no conservados en otras proteínas PerR. Sin embargo, FurC sí que mantiene conservados en mayor medida los residuos que coordinan el sitio de unión del metal regulador en otras proteínas PerR. En PerR de *B. subtilis*, el regulador PerR mejor caracterizado hasta la fecha, este sitio está formado por los residuos His37, His91, His93, Asp85 y Asp104. De estos residuos, His37, His91, His93 y Asp104 se encuentran conservados en FurC de *Anabaena*, siendo los equivalentes His45, His98, His100, Asp111 respectivamente, siendo Asp85 el único residuo no conservado (Figura 20).

An	MQQQAISTKPIRSLEDALERCQLLGMRVSRQRRFILELLWQANEHLSAREIYDRLNQQGK	61
Bs	-----MAAHELKEALETLKETGVRI TPQRHAILEYLVNSMAHPTADDIYKALEGKFP	53
Cj	-----MELLQMLKKHELKATPQRLC <sup>V</sup> LKILKR-HE <sup>H</sup> PNIDELYIEIKKEYP	46
Li	-----MKDSYERSKKILEDAGINVTVQRLQMANLLLSKPO <sup>H</sup> LTADQVFQLINEHMP	52
Sp	-MDI <sup>H</sup> <sup>S</sup> <sup>H</sup> QQALDAYEN <sup>V</sup> LE <sup>H</sup> LREKHIRITETRKAIISYMIQSTEHPADKIYRDLQPNFP	60
An	DIGHTSVYQNLEALSTQGIIESIERC--DGRLYGNISDSHSHVNC <sup>L</sup> LDTNQILDVHIQLPE	120
Bs	NMSVATVYNNLRVFRFRESGLVKELTYG-DASSRFD <sup>F</sup> VTS <sup>D</sup> H <sup>Y</sup> HAI <sup>C</sup> EN <sup>C</sup> GKIV <sup>D</sup> FHYPLD	113
Cj	SISLATVYKNLNTLQEQGLVVEINVL-NQKT <sup>C</sup> <sup>D</sup> IYEE <sup>H</sup> <sup>I</sup> H <sup>V</sup> <sup>V</sup> <sup>C</sup> TK <sup>C</sup> GGIEDLSFKDAK	106
Li	NASRATIFNNLKLFAEKGI <sup>V</sup> NLLELK-SGITLY <sup>D</sup> SNVI <sup>H</sup> <sup>H</sup> <sup>H</sup> AIDEKTGEIY <sup>D</sup> ISLDSKL	112
Sp	NMSLATVYNNLKVLDVDEGFVSELKISNDLTTYDFMG <sup>H</sup> <sup>Q</sup> <sup>H</sup> VNVV <sup>C</sup> EI <sup>C</sup> GKIADFMVDVDM	121
An	AFIQEVEQRTGVKITD-YSINFYGYRHPQDEE-----	149
Bs	EVEQLAAHVTGFKVSH-HRLEIYGV <sup>C</sup> Q <sup>E</sup> <sup>C</sup> SKKENH-	145
Cj	LYEYQEHLEKKIGNLV-NHLSV <sup>C</sup> AYVDN <sup>C</sup> KK <sup>C</sup> H----	136
Li	QEKVLSELKQDFKLTGSSLEN <sup>C</sup> NLSITLKGKKNP-	145
Sp	DIAKEAHEQTGYKVTR-IPVIA <sup>Y</sup> GI <sup>C</sup> PD <sup>C</sup> QAKDQSD <sup>F</sup>	155

**Figura 20. Alineamiento de ClustalW de la secuencia primaria de la proteína FurC/PerR de *Anabaena* sp. PCC7120 (An) con las de PerR de *B. subtilis* (Bs), *C. jejuni* (Cj), *L. interrogans* (Li) y *S. pyogenes* (Sp).** Los residuos de cisteína se muestran en rojo y negrita. Las cisteínas que coordinan el metal estructural Zn en cada estructura cristalográfica resuelta se muestran subrayadas. Los residuos que coordinan el metal regulador en *B. subtilis*, *C. jejuni*, *L. interrogans* y *S. pyogenes* se muestran en azul y subrayados. Los 2 residuos de histidina oxidables por MCO en PerR de *B. subtilis* se muestran en negrita. Los residuos conservados en FurC correspondientes a los aminoácidos que coordinan el metal regulador en PerR de *B. subtilis* se muestran en azul. Los residuos propuestos en este trabajo como sustitutos en FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 del aminoácido D85 del sitio regulador de PerR de *B. subtilis* se muestran en negrita.

Debido a sus características y cercanía a la posición del Asp85 en *B. subtilis*, tanto la Asn93 como el Asp96 podrían ser el quinto residuo que coordina el metal regulador en FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.

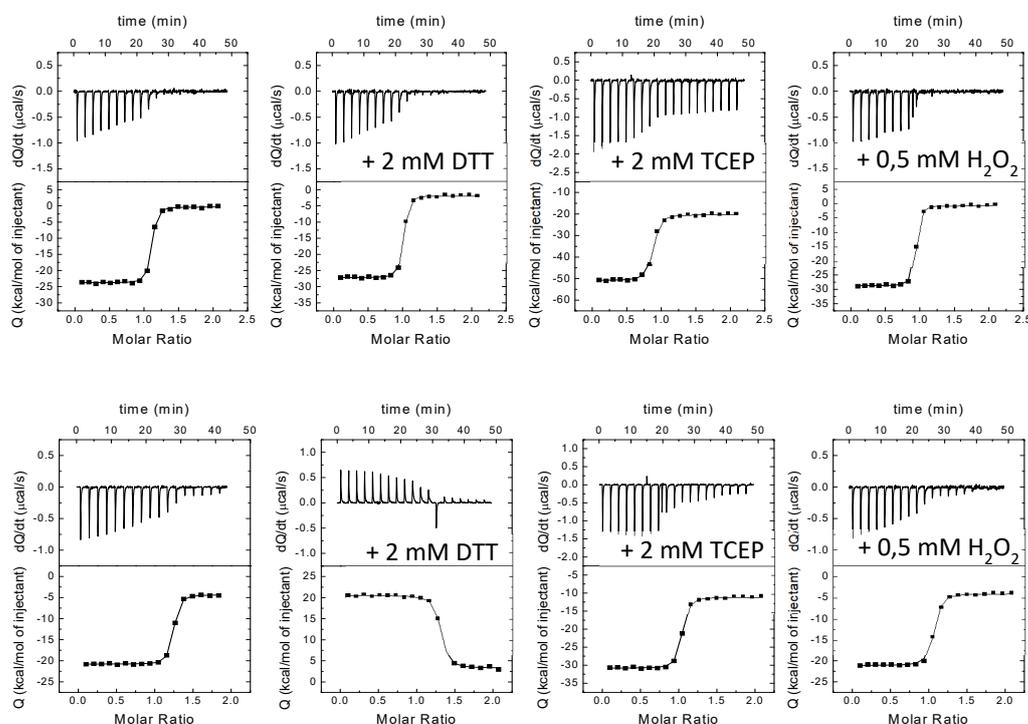
#### 4.1.2.2. FurC presenta un átomo de zinc fuertemente unido.

A pesar de observar que FurC estaba desprovista de los sitios CXXC canónicos que normalmente coordinan el zinc estructural en otros ortólogos PerR (Figura 20), se analizó el contenido en metales de la proteína mediante ICP-OES (*Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*). Estos ensayos fueron realizados por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia). El análisis determinó la presencia de  $0,86 \pm 0,14$  mol Zn/ mol FurC en la fracción de FurC tras la purificación. Esto vendría a confirmar que, a pesar del tratamiento con 10 mM de EDTA desde la rotura de las células y durante la primera etapa de la cromatografía, aproximadamente todas las moléculas de FurC mantienen alrededor de 1 átomo de Zn unido en su estructura, lo cual indicaría que este átomo de zinc está fuertemente unido a FurC, sugiriendo

así su función estructural. De aquí en adelante, en los experimentos de caracterización realizados con FurC purificada, esta se denominará FurC:Zn.

**4.1.2.3. Interacción de FurC:Zn con Mn<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>: diferentes efectos en la actividad de FurC.**

Además del metal estructural, las proteínas de la familia Fur contienen un sitio de unión a metal regulador que modula la unión al DNA. En el caso de FurC, ya se conocía el requerimiento de manganeso para su actividad, aunque se desconocían las características de esta unión. Con el objetivo de caracterizar las potenciales interacciones con metales en el sitio regulador de FurC:Zn, se realizaron experimentos de ITC en presencia de manganeso o zinc en diferentes condiciones redox (Figura 21).



**Figura 21. Interacción de FurC con Zn<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> en diferentes condiciones redox.** A) Interacción de FurC con Mn<sup>2+</sup>. B) Interacción de FurC con Zn<sup>2+</sup>. Se muestran las representaciones (dQ/dt vs. tiempo y Q vs. Ratio molar proteína/ligando) de las medidas realizadas en el calorímetro. Todas las soluciones se prepararon en el tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM.

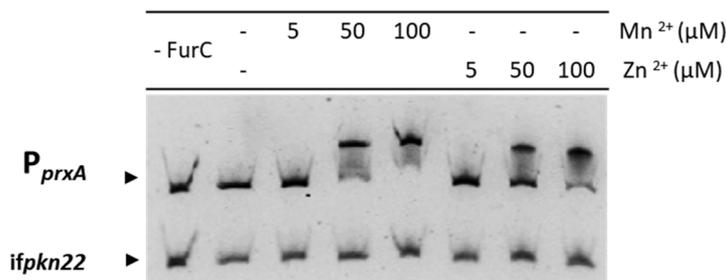
La Figura 21.A y Tabla 9 muestran que FurC:Zn es capaz de interactuar con 1 mol de Mn<sup>2+</sup> por mol de proteína independientemente de las condiciones oxidantes o reductoras. De hecho, tras el tratamiento de la proteína con 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ésta no vio afectada su afinidad por Mn<sup>2+</sup>. De igual forma, FurC fue capaz de interactuar con un átomo de Zn<sup>2+</sup> adicional (además del que ocupa el sitio “estructural”) en todas las condiciones redox probadas y con una constante de

disociación del mismo orden de magnitud que la mostrada con el  $Mn^{2+}$  (Figura 21.B y Tabla 9). Estos resultados sugerían que el estado redox de las cisteínas de FurC no afectaba a la unión del metal regulador, lo que estaría de acuerdo con la ausencia de cisteínas en el sitio propuesto para la interacción con el metal regulador (apartado 4.1.3).

**Tabla 9. Valores de las constantes de afinidad y número de sitios de unión para la interacción FurC:Zn con  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ .** Se muestran los valores de la constante de disociación ( $K_d$ ) y el número de sitios de unión ( $n$ ).

	$K_d$ ( $\mu M$ )	$n$
<b>FurC:Zn vs <math>Mn^{2+}</math></b>	0,016	1,1
<b>FurC:Zn vs <math>Mn^{2+}</math> (+ DTT)</b>	0,017	0,96
<b>FurC:Zn vs <math>Mn^{2+}</math> (+ TCEP)</b>	0,047	0,83
<b>FurC:Zn vs <math>Mn^{2+}</math> (+ <math>H_2O_2</math>)</b>	0,015	0,86
<hr/>		
<b>FurC:Zn vs <math>Zn^{2+}</math></b>	0,019	1,2
<b>FurC:Zn vs <math>Zn^{2+}</math> (+ DTT)</b>	0,033	1,2
<b>FurC:Zn vs <math>Zn^{2+}</math> (+ TCEP)</b>	0,026	1,0
<b>FurC:Zn vs <math>Zn^{2+}</math> (+ <math>H_2O_2</math>)</b>	0,035	1,0

Puesto que los análisis de ITC produjeron datos similares cuando FurC interaccionaba con  $Mn^{2+}$  o con  $Zn^{2+}$ , se estudió si la interacción con ambos iones tenía un efecto similar en la actividad de unión al DNA. Para probar los efectos de la presencia de estos metales, se realizaron ensayos de EMSA frente al promotor de *prxA* con diferentes concentraciones de ambos iones metálicos.



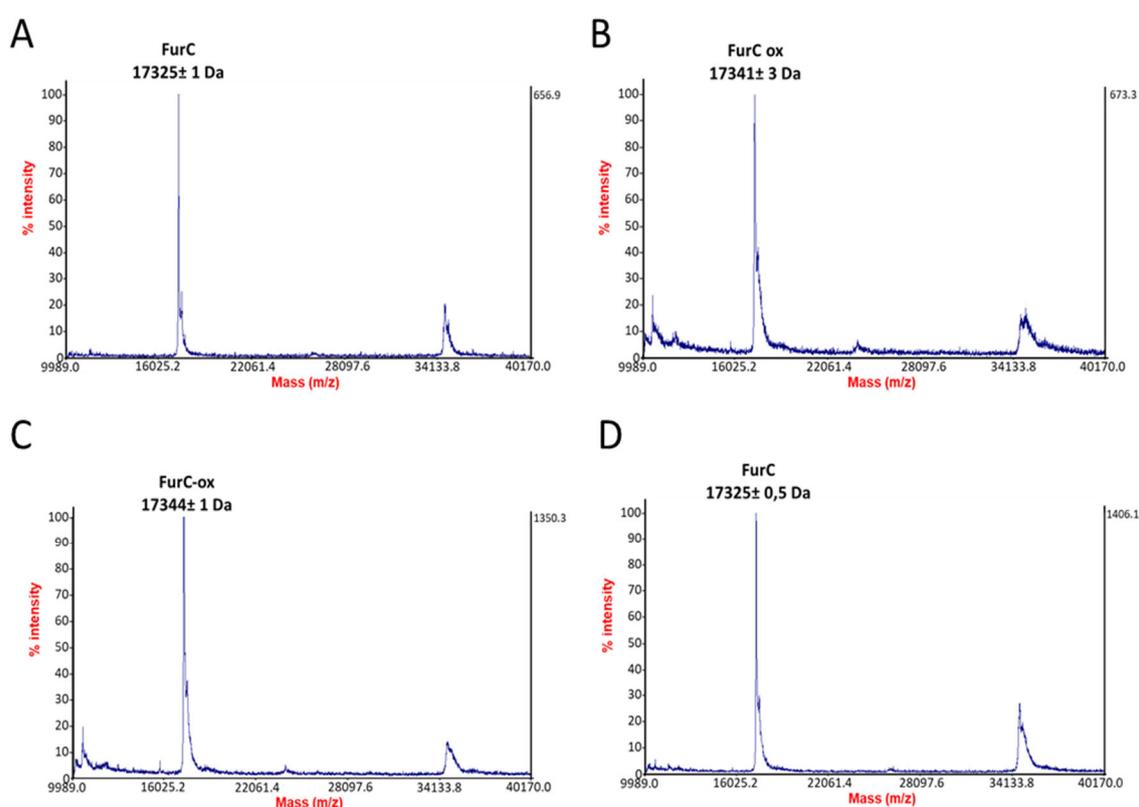
**Figura 22. Ensayo de EMSA de la interacción entre FurC (PerR) y la región promotora del gen *prxA* en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ .** Como control de unión no específica se utilizó la región interna del gen *pkn22* (*ifpkn22*). Carril 1 DNA libre, carriles 2-8 DNA incubado con 200 nM de FurC sin iones metálicos divalentes añadidos (-) o en presencia de 5, 50, 100  $\mu M$  del ion metálico divalente indicado (2-8). Las mezclas se incubaron en el tampón de unión Bis-Tris 10 mM pH 7,5, KCl 40 mM, DTT 1 mM, glicerol 5 % y BSA 0,05 mg/mL y se cargaron en un gel nativo de 6 % poliacrilamida.

Como se observa en la Figura 22, FurC fue capaz de unirse al promotor diana en presencia de ambos metales divalentes,  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ , aunque la concentración de  $Mn^{2+}$  necesaria para la lograr

un retardo completo del DNA fue menor que la de  $Zn^{2+}$ . De este ensayo también se evidencia el requerimiento específico de metal divalente para su actividad.

#### 4.1.2.4. Identificación mediante MALDI-TOF/MS de la incorporación de un átomo de oxígeno en FurC por oxidación catalizada por metal (MCO)

Los análisis de la secuencia de FurC mostraron la presencia del residuo conservado Asp 111, que se alinea con Asp104 en la secuencia de PerR de *B. subtilis* (Figura 20). Este residuo es fundamental en la interacción con el metal regulador y se ha propuesto que es un aminoácido clave para la modulación de la sensibilidad de PerR a  $H_2O_2$ , favoreciendo la incorporación de un átomo de oxígeno en la proteína tras la oxidación catalizada por metal (Lee & Helmann, 2006b). Dado que FurC, presentaba el residuo conservado Asp111 y se había propuesto previamente su inactivación por oxidación catalizada por metal (Yingping et al., 2014), quisimos comprobar mediante espectrometría de masas si la proteína era capaz de incorporar un átomo de oxígeno siendo así oxidada irreversiblemente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23.

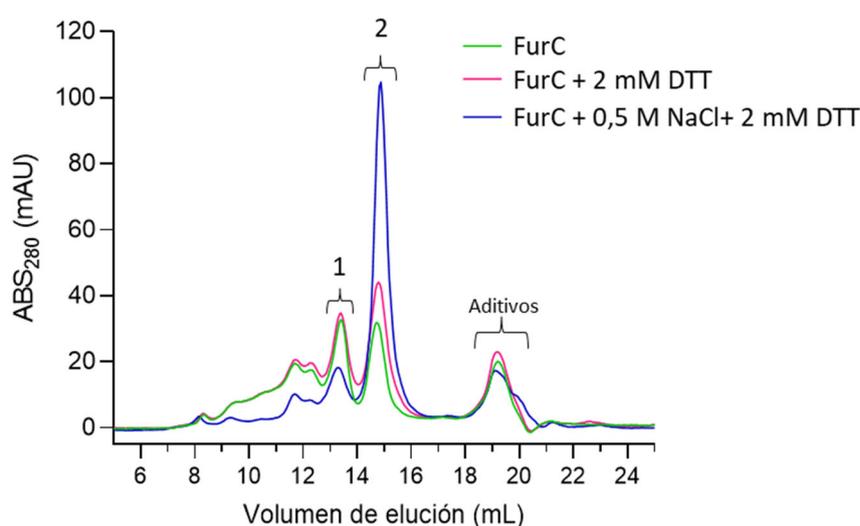


**Figura 23. Perfiles de los espectros de masas MALDI-TOF-MS de FurC:Zn realizados para demostrar su oxidación mediada por MCO.** Previamente a la determinación, se trataron  $40 \mu M$  de FurC:Zn con  $40 \mu M$  de  $MnCl_2$  o  $40 \mu M$  de  $FeSO_4$  recién preparados durante 30 min en condiciones aeróbicas. Posteriormente las muestras fueron tratadas con o sin  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$  y dializadas frente a Tris-HCl  $50 mM$  pH 7,5, NaCl  $150 mM$ . (A) FurC:Zn sin tratamiento (B) FurC:Zn incubado con  $Fe^{2+}$  (C) FurC:Zn incubada con  $Fe^{2+}$  y  $H_2O_2$ , (D) FurC:Zn incubada con  $Mn^{2+}$  y  $H_2O_2$ .

La incorporación de átomos de oxígeno a la estructura de FurC se monitorizó con el incremento de masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/MS. La Figura 23.A muestra que la masa molecular observada de FurC incubada sin ningún aditivo, fue de 17325 Da, respecto al peso molecular teórico 17328 Da. Tras la incubación de FurC en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ , la masa molecular del pico principal de FurC aumentó +16 Da (lo correspondiente a un átomo de oxígeno), incluso tras la incubación en ausencia de otros oxidantes además del  $\text{O}_2$ , así como en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 23.B, C). Sin embargo, la oxidación de FurC:Zn en condiciones oxidantes severas (presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no tuvo lugar cuando en la incubación estaba presente  $\text{Mn}^{2+}$  en lugar de  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 23.D), lo que concuerda con el mecanismo de acción canónico de proteínas PerR. La supresión de la actividad de unión al DNA de FurC:Zn por MCO se confirmó mediante ensayos de EMSA (Figura 28, apartado 4.1.2.7).

#### 4.1.2.5. Estudios de la oligomerización de FurC en condiciones nativas

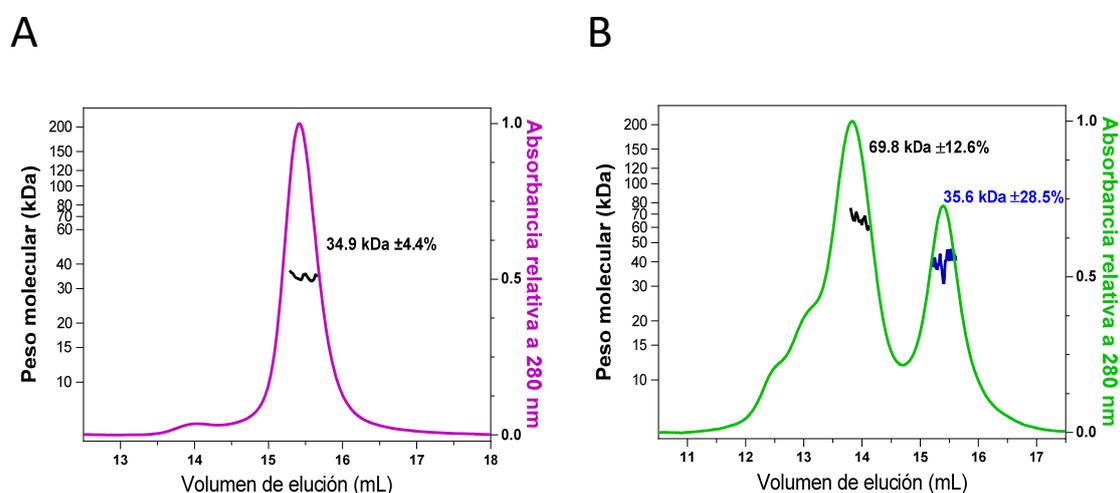
En vista de que las proteínas Fur y PerR pueden existir en diferentes estados oligoméricos, se investigó el estado de oligomerización en solución de la proteína FurC:Zn. Estos análisis se realizaron en colaboración con la Dra. Isabelle Michaud-Soret del LCBM (CEA-Grenoble, Francia). En primer lugar, se estudió el estado de oligomerización de FurC purificada e incubada en diferentes condiciones redox y de fuerza iónica. Para ello se utilizó una cromatografía de filtración en gel Superdex™ 200 Increase 10/300 (Figura 24).



**Figura 24. Análisis del perfil elución de cromatografía de exclusión molecular (SEC) de FurC:Zn incubada en diferentes condiciones.** FurC:Zn purificada mediante columnas de unión a heparina y DEAE en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM se incubó sin aditivos (verde), con DTT 2 mM durante 15 min (rosa) y con NaCl 0,5 M durante 30 min y con DTT 2 mM durante 10 min (azul) antes de su separación en una columna Superdex™ S200 Increase 10/300 equilibrada en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl, glicerol 10 %.

Posteriormente, se determinó el peso molecular de las formas encontradas mediante (SEC-MALLS-RI). La Figura 24 muestra el perfil de elución de una cromatografía de exclusión por tamaño de FurC:Zn purificada, que había sido incubada previamente en diferentes condiciones. Cabe destacar que la relación entre el pico 1 y el pico 2 cambia ligeramente tras la adición de DTT, y la presencia de DTT y NaCl 0,5 M produce un aumento notable del pico 2. Como se comprobó posteriormente en ensayos de SEC-MALLS-RI, este pico 2 correspondería con la forma dimérica de FurC:Zn (Figura 25.A).

Para determinar los pesos moleculares y el grado de oligomerización de los diferentes consorcios de FurC:Zn presentes en los picos 1 y 2, estas fracciones se agruparon, concentraron y analizaron cada una de ellas por SEC-MALLS-RI (Figura 25).



**Figura 25. Determinación del peso molecular mediante SEC-MALLS-RI de los estados oligoméricos de FurC:Zn aislados en SEC.** Se muestran los perfiles de SEC-MALLS-RI de las formas de FurC contenidas en las fracciones de los picos 1 (A) y 2 (B) de la SEC (Ver Figura 24). Las fracciones obtenidas en SEC se concentraron hasta 1.5-2 mg/mL y analizaron cargando 20  $\mu$ L en la columna Superdex™ S200 Increase 10/300 incluida en el sistema SEC-MALLS-RI, equilibrado previamente en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 150 mM NaCl, glicerol 10 %.

Los análisis SEC-MALLS-RI mostraron que los dos picos principales con volúmenes de elución de 13,4 (pico 1) y 14,8 mL (pico 2) corresponden a los pesos moleculares de FurC:Zn como tetrámero ( $69,84 \pm 12,6\%$  kDa) y como dímero ( $34,87 \pm 4,4\%$  kDa) respectivamente (Figura 25.A, B) siendo el peso molecular teórico de una subunidad de FurC, 17328 Da

Puesto que el pico 2, cuyo peso molecular correspondía con un dímero, aumentaba considerablemente en condiciones reductoras (Figura 25.A), se podría concluir que el dímero se trataba de la forma oligomérica más reducida del regulador. Sin embargo, se realizó un control

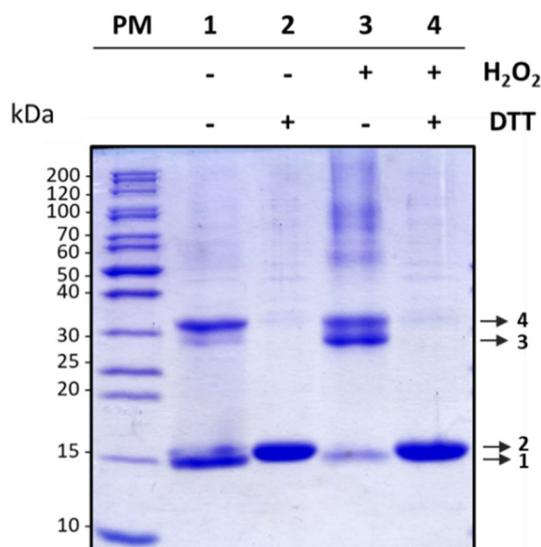
para confirmar que el dímero del pico 2 determinado por SEC-MALLS-RI no se trataba de una forma reoxidada tras la SEC, ya que a pesar de utilizar DTT en la preincubación no se utilizaron agentes reductores en ningún tampón de la columna. Para ello, se realizó un experimento añadiendo 0,5 mM TCEP en el tampón de las columnas durante todo el proceso (apartado 4.1.4, Figura 33.B.). Este resultado indicó que (1) el estado oligomérico obtenido tras la prerreducción no variaba durante el proceso previo (concentración y/o congelación) a los análisis de SEC-MALLS-RI y confirmaba que los puentes disulfuro intermoleculares no están involucrados en la dimerización de FurC:Zn, siendo el dímero la forma más reducida del regulador en solución.

Por otra parte, el perfil SEC-MALLS-RI del pico 1 (Figura 25.B) reveló que su composición era una mezcla de dímeros y tetrámeros de FurC:Zn, siendo el tetrámero la forma más abundante del regulador en el pool (Figura 25.B). La mezcla resultante podría deberse a una difícil separación de las formas FurC:Zn por SEC o a un equilibrio entre dímero y tetrámero como se ha descrito previamente para para la proteína Fur de *E. coli* (D'autréaux et al., 2007). Por otro lado, la Figura 24 muestra la disociación de una fracción de tetrámeros de FurC en dímeros tras la adición de sal, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas contribuirían probablemente en gran medida a estabilizar los tetrámeros formados por la dimerización dependiente de oxidación de los dímeros de FurC, cuya formación se estudia más en detalle en el apartado 4.1.2.7.

#### 4.1.2.6. Análisis de la formación de puentes disulfuro en FurC

Para obtener más información sobre la interacción entre las subunidades de FurC:Zn, se evaluó la formación de puentes disulfuro de la proteína purificada e incubada en diferentes condiciones redox, mediante análisis por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) no reductora (Figura 26).

En todas las condiciones probadas, las muestras incubadas se trataron con SDS y se hirvieron durante 5 min, con lo que se aseguró que la proteína estuviera desnaturizada y únicamente los enlaces covalentes se mantuvieran en las moléculas de la preparación. La Figura 26 muestra que tras la ruptura de interacciones no covalentes entre monómeros de FurC, en el gel se observan varias bandas formadas por el regulador que cambian dependiendo del entorno redox.

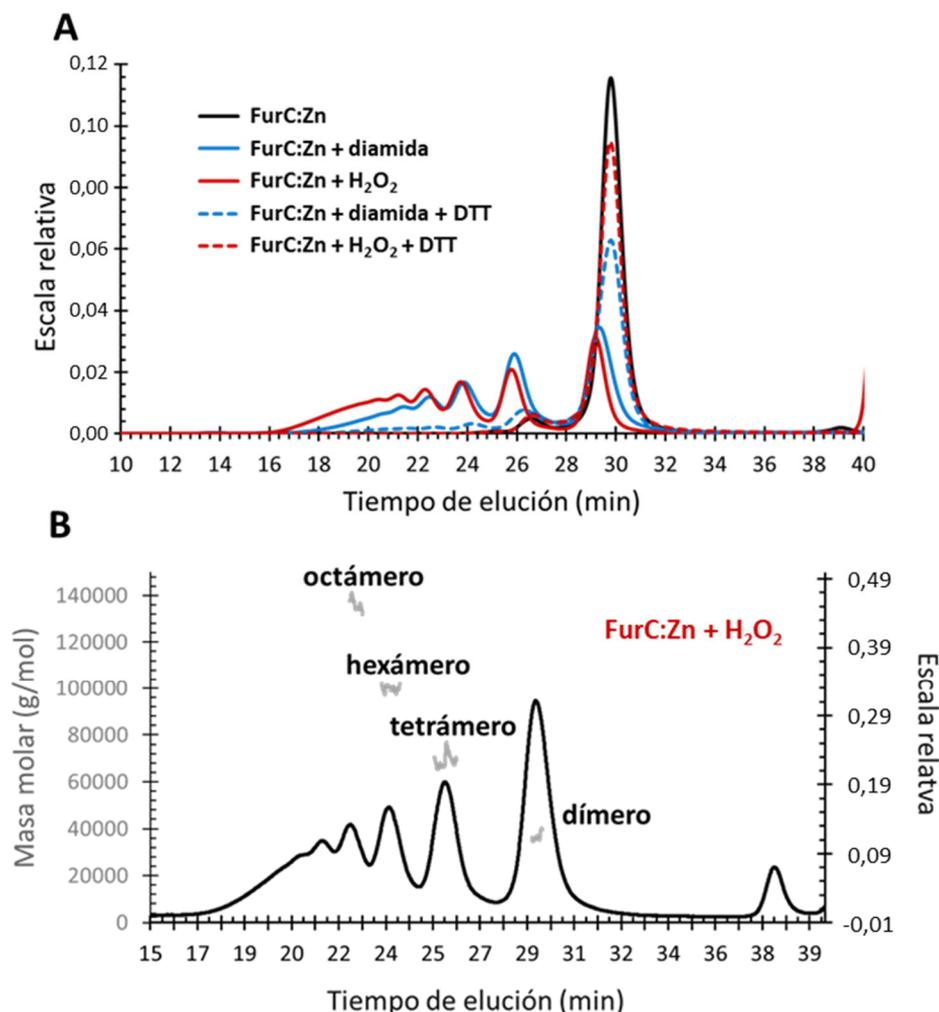


**Figura 26. Efecto de la oxidación-reducción en la movilidad electroforética de las isoformas FurC:Zn.** El gel SDS-PAGE no reductor al 17 % teñido con azul de Coomassie muestra la presencia de enlaces disulfuro en 20  $\mu$ M FurC:Zn incubada en diferentes condiciones. (1) FurC:Zn sin tratar, (2) FurC:Zn incubada con 10 mM DTT durante 10 min, (3) FurC:Zn tratada con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min (4) FurC:Zn tratada con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubada posteriormente con 10 mM DTT durante 10 min. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador. La presencia de diferentes isoformas de FurC:Zn se indica mediante flechas.

La preparación de proteína FurC:Zn previamente purificada por unión a heparina y DEAE-celulosa e incubada sin ningún aditivo mostró 2 bandas principales en SDS-PAGE, una correspondiente con el peso de una subunidad de FurC ( $\approx$ 17 kDa) y otra correspondiente con el peso de 2 subunidades (carril 1). A su vez estas se resolvían cada una en dos bandas (1 y 2) y (3 y 4) respectivamente. Así mismo, el tratamiento con DTT (carril 2) eliminó eficientemente las bandas 3 y 4 presentes en el carril 1, dando una sola banda con la misma movilidad que la banda 2 del carril 1, evidenciando que FurC es capaz de establecer puentes disulfuro intermoleculares. Curiosamente, el tratamiento de FurC:Zn purificada con fuertes condiciones oxidantes (presencia de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (carril 3) condujo a la formación de agregados de mayor peso molecular y al enriquecimiento de las bandas correspondientes a las mismas movilidades que las bandas 1 y 3 presentes en el carril 1. Este proceso es revertido por el tratamiento con DTT 10 mM (carril 4) que reduce completamente las cisteínas de FurC:Zn, lo que confirma la participación de los enlaces disulfuro en el proceso de oligomerización observado por SEC.

#### 4.1.2.7. Reversibilidad del estado oligomérico de FurC tras la oxidación y reducción

Para investigar si la subunidad formada por puentes disulfuro observada en el SDS-PAGE se trataba de una forma oxidada del dímero de FurC en condiciones nativas, se estudió el efecto del  $H_2O_2$  y la diamida en una muestra del dímero de FurC:Zn. La proteína se purificó en condiciones no desnaturalizantes y antes de la cromatografía de exclusión molecular en (SEC), se incubó en diferentes condiciones tal y como se indica en la Figura 27.A.



**Figura 27. Estudio de la reversibilidad de la oxidación del dímero de FurC:Zn mediante SEC-MALLS-RI.** A) Perfil de elución de SEC de diferentes alícuotas de FurC:Zn dímero a 2 mg/mL (122  $\mu$ M) en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, incubado previamente: sin ningún aditivo (negro), con 5 mM diamida durante 30 min (línea azul continua); con 5 mM  $H_2O_2$  durante 30 min (línea roja continua); con 5 mM diamida durante 30 min seguido de 10 mM DTT durante 10 min (línea azul discontinua) o con 5 mM  $H_2O_2$  durante 30 min seguido de 10 mM DTT durante 10 min (línea roja discontinua). La cromatografía se realizó en una columna Superdex™ S200 Increase 10/300 equilibrada en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 10 % con un flujo de 0,5 mL/min. B) Determinación de la masa molar mediante SEC-MALLS-RI de las fracciones eluidas de la muestra de FurC dímero tratado con  $H_2O_2$  mostrando la presencia de oligómeros bien definidos. El perfil de absorbancia a 280 nm se muestra junto con los valores de masa molar.<sup>27</sup>

La incubación de FurC:Zn con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o diamida, generó el mismo patrón de elución con picos bien definidos correspondientes a diferentes estados oligoméricos con mayor grado de agregación que el dímero de FurC:Zn, cuya formación también podía intuirse en las bandas con mayor peso molecular que aparecen en el SDS-PAGE no reductor (Figura 26). Por otro lado, la adición de DTT (Figura 27.A) desencadenó la reducción total de las cisteínas de FurC:Zn como ya se había observado en los ensayos de SDS-PAGE (Figura 26), revirtiendo completamente la oligomerización para reformar las especies diméricas (Figura 27.A).

La Figura 27.B muestra la masa molar calculada para cada pico de elución tras la separación y análisis por SEC-MALLS-RI. Las masas de los picos corresponden con las formas de FurC como dímero, tetrámero, hexámero e incluso octámeros y oligómeros de mayor peso molecular formados tras la oxidación del dímero (Tabla 10).

**Tabla 10. Masas teóricas y experimentales de la subunidad y oligómeros de FurC.**

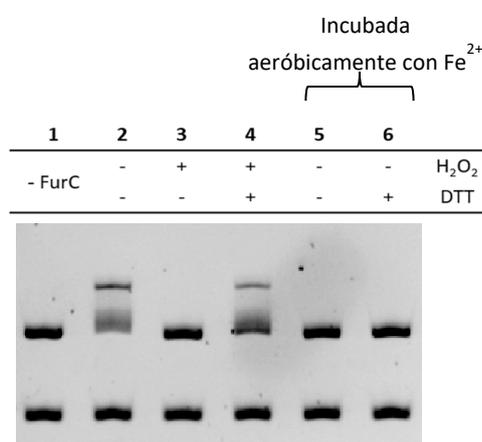
Masa teórica (Da)	Estado oligomérico	Masa experimental SEC-MALLS-RI (Da)
17328	monómero	-
<b>34656</b>	<b>dímero</b>	<b>36500 ± 7,8 %</b>
51984	trímero	-
<b>69312</b>	<b>tetrámero</b>	<b>69000 ± 7,3 %</b>
86640	pentámero	-
<b>103968</b>	<b>hexámero</b>	<b>100200 ± 6,2 %</b>
121296	heptámero	-
<b>138624</b>	<b>octámero</b>	<b>136500 ± 5,5 %</b>

En conjunto, los resultados demuestran que FurC es capaz de oligomerizar mediante la formación de puentes disulfuro tras la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o diamida, proceso que se revierte tras la reducción con DTT para formar dímeros de FurC.

#### **4.1.2.8. Efecto de la oxidación reversible o irreversible de FurC en su actividad de unión al DNA.**

La reversibilidad de la inactivación de FurC por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la incubación del regulador en ausencia o presencia de Fe<sup>2+</sup> en condiciones aeróbicas, se monitorizó mediante ensayos de retardo en gel (Figura 28). Previamente al ensayo de EMSA, se incubaron 40 μM de FurC:Zn con 10 mM de DTT para conseguir su reducción y a continuación se eliminó el DTT de la fracción con

una membrana concentradora. Posteriormente, se incubaron 20  $\mu\text{M}$  de FurC:Zn reducida en condiciones aerobias en ausencia o presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  durante 5 min y se sometieron a la oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y posterior tratamiento con DTT para evaluar la reversibilidad de la inactivación de FurC. Los resultados mostrados en la Figura 28 indicaron por un lado que la oxidación catalizada por metal promovida por  $\text{Fe}^{2+}$  inactivó irreversiblemente al regulador, como ya se había observado previamente para FurC y otros parálogos PerR (Ji et al., 2015, Yingping et al., 2014, Lee & Helmann, 2006b). Por el contrario, la inactivación de FurC tras la oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia de metal divalente se revirtió mediante la adición de DTT, hecho que ocurría de igual forma cuando la oxidación se realizaba con la proteína preincubada con  $\text{Mn}^{2+}$  (resultados no mostrados), lo que confirmaba que se trataba de una oxidación mediada por puentes disulfuro e independiente de metal.

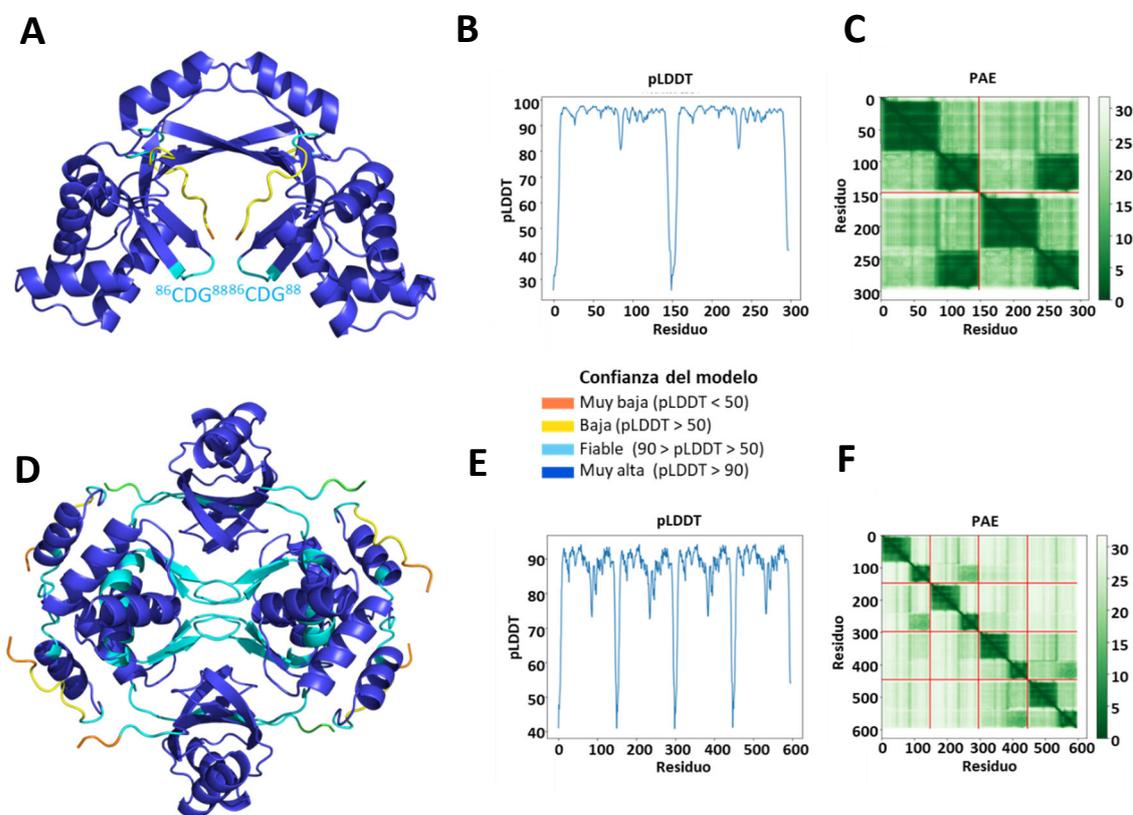


**Figura 28. Ensayos de retardo en gel mostrando la actividad de FurC:Zn en diferentes condiciones redox.** El carril 1 contiene DNA libre, los carriles 2-6 contienen el DNA incubado con 200 nM de FurC:Zn tratada en diferentes condiciones: (2) FurC:Zn prerreducida, (3) FurC:Zn prerreducida tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM, (4) FurC:Zn prerreducida tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM y luego con DTT 10 mM, (5) FurC:Zn prerreducida incubada con  $\text{Fe}^{2+}$ , (6) FurC:Zn prerreducida incubada con  $\text{Fe}^{2+}$  y tratada con DTT 10 mM. Como DNA, se utilizó el promotor *prxA* como diana específica de FurC y una región interna del gen *pkn22* como control inespecífico. La proteína se incubó con el DNA en un tampón que contenía Bis-Tris 10 mM, pH 7,5, KCl 40 mM,  $\text{MnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ , glicerol 5 % y BSA 0,05 mg/mL.

#### 4.1.3. Modelado de la estructura tridimensional del dímero y tetrámero de FurC

Con objeto de elucidar las bases bioquímicas y estructurales de la oligomerización de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 se modeló la estructura tridimensional de FurC como dímero y tetrámero utilizando AlphaFold colab (Varadi et al., 2022, Jumper et al., 2021), una versión del servidor AlphaFold para la predicción de la estructura tridimensional de proteínas que no utiliza estructuras homólogas como plantillas, sino que predice el modelo a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína y un sistema de subredes neuronales que refinan la estructura del

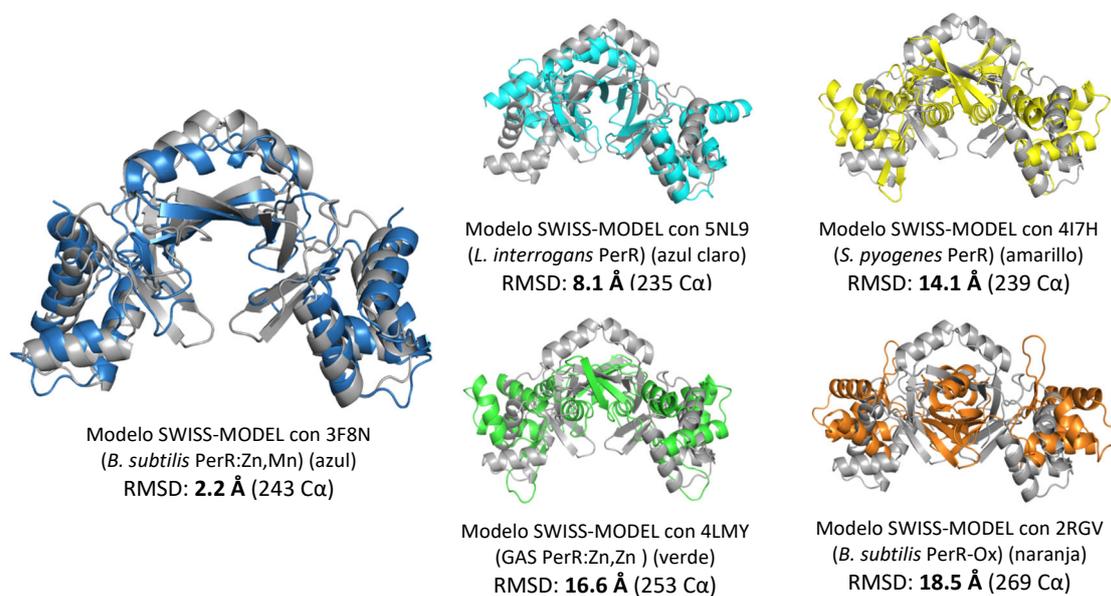
modelo. El modelo obtenido para el dímero de FurC y sus parámetros estadísticos se muestran en la Figura 29.A, B, C.



**Figura 29. Modelos de un dímero y un tetrámero de FurC predichos por AlphaFold colab.** Los modelos están coloreados según el parámetro de confianza pLDDT (Predicted Local Distance Difference Test). A) Modelo de un dímero de FurC donde se muestra la posición del residuo Cys86 en el bucle 86-88. Gráficos para el dímero de B) sus valores pLDDT y C) PAE (Predicted Aligned Error). D) Modelo del tetrámero de FurC. Gráficos para el tetrámero de E) sus valores de pLDDT y F) PAE.

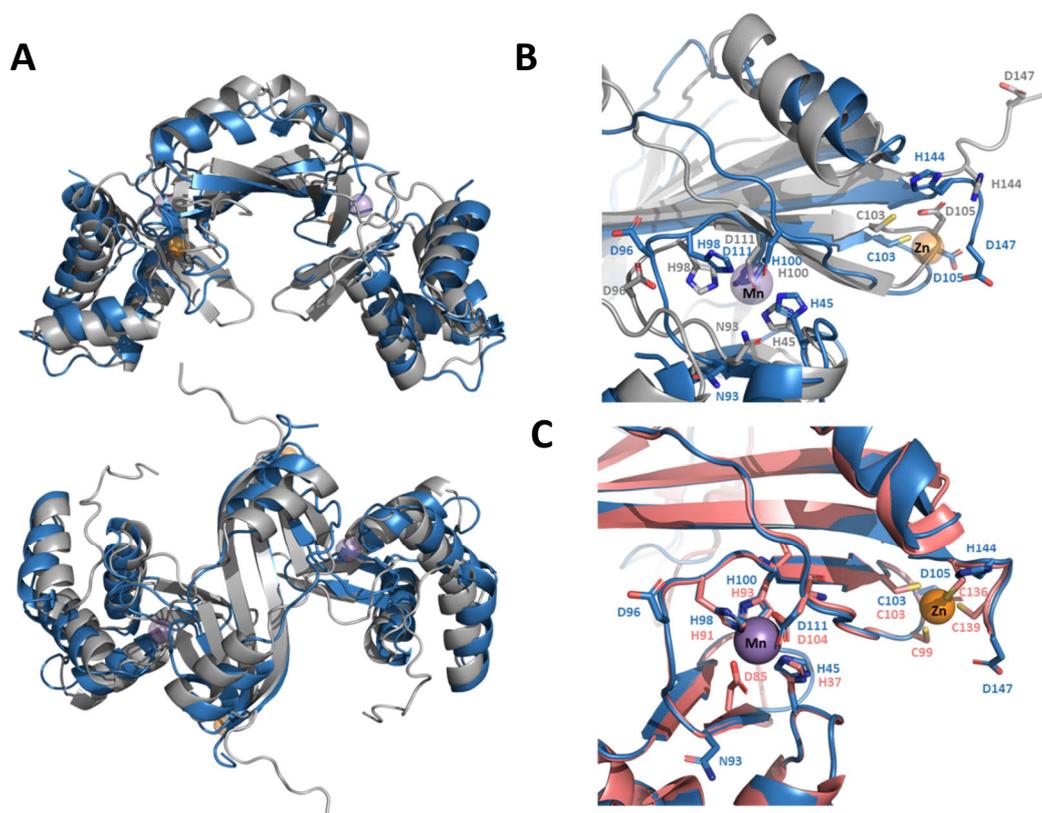
En base a los valores pLDDT (*Predicted Local Distance Difference Test*), el modelo del dímero de FurC generado por AlphaFold presenta en general un alto nivel de confianza para cada monómero. Solo las secuencias N y C terminales muestran valores de fiabilidad bajos (Figura 29.B). Además, la puntuación de fiabilidad para el bucle<sup>86</sup>CDG<sup>88</sup> presentó un valor pLDDT alrededor de 87, que en la escala de confianza ( $90 > \text{pLDDT} > 70$ ) se considera una predicción con alto nivel de confianza (Figura 29.B). La confianza de la posición relativa de los monómeros dentro del dímero se puede inferir del gráfico que muestra los valores PAE (*Predicted align error*). De acuerdo con los valores más bajos de PAE, la región comprendida entre los residuos 100-150 de ambos monómeros se predice como una posición relativa bien definida (Figura 29.C). Esto significa que en el modelo del dímero de FurC, la secuencia 100-150 interactúa preferentemente con la secuencia equivalente en el otro monómero, estabilizando el dímero como ya se ha descrito en otros dímeros de Fur y de PerR

El dímero de FurC obtenido por AlphaFold se comparó con varios modelos de FurC generados utilizando SWISS-MODEL, un programa de predicción que utilizó como plantillas estructuras cristalográficas de proteínas PerR con secuencias homólogas a la de FurC (Figura 30). Atendiendo a los valores de desviación estándar (RMSD, *Root Mean Square Deviation*) tras la superposición de los modelos correspondientes, el dímero de AlphaFold mostró mayor similitud con el modelo de SWISS-MODEL que utilizaba la estructura de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis* (PDB 3F8N) como plantilla, por lo que se seleccionó este modelo para posteriores evaluaciones. La superposición de ambos modelos permitió estudiar en detalle la arquitectura de los posibles sitios de unión a metal en FurC (Figura 31.A, B).



**Figura 30. Comparativa estructural del modelo de dímero de FurC de AlphaFold con los modelos de SWISS-MODEL generados a partir de diferentes estructuras cristalográficas del regulador PerR. Para cada superposición se muestran valores RMSD del alineamiento.**

Respecto al potencial sitio de unión a metal regulador, ambos modelos indican que las histidinas 45, 98, 100 y el aspartato 111 podrían actuar como residuos coordinadores, los cuales están conservados en PerR de *B. subtilis* (Figura 20). Sin embargo, el quinto residuo involucrado en la unión de  $Mn^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  en PerR de *B. subtilis*, el Asp85, no está conservado en FurC (Figura 20). En su lugar, los modelos de FurC muestran que los residuos Asn93 o Asp96 podrían estar implicados en la coordinación del metal regulador en FurC.

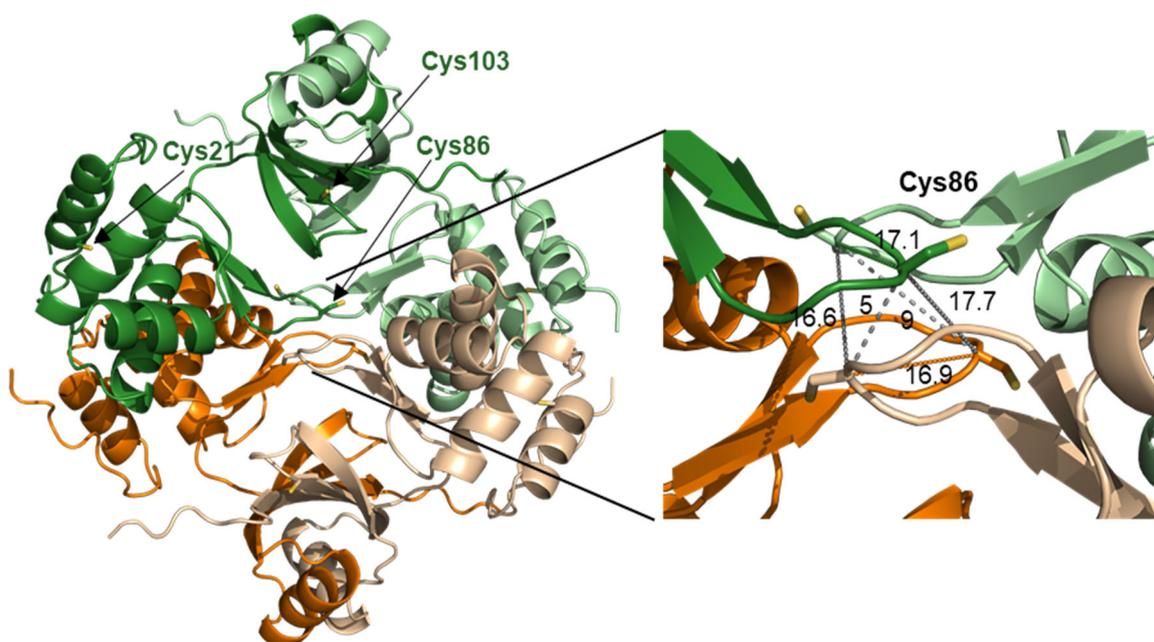


**Figura 31. Comparación de los modelos de dímero de FurC de AlphaFold colab y SWISS-MODEL.** La estructura de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis* (PDB 3F8N) se usó como plantilla para los modelos de SWISSMODEL. A) Superposición de los modelos de dímero de FurC de AlphaFold (gris) y SWISS-MODEL (azul). B) Detalle de los sitios de unión a metal en los modelos de AlphaFold (gris) y SWISS-MODEL (azul). (C) Sitios de unión a metal en el modelo de SWISS-MODEL (azul) superpuesto con su plantilla (estructura de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis* (PDB: 3F8N)) (rosa). Los metales presentes en la Figura 31.B corresponden a una simulación a partir de la posición de los metales presentes en la estructura de la PerR:Zn,Mn de *B. subtilis*.

Respecto al sitio de unión a metal estructural, a pesar de que FurC carece de los motivos CXXC que comúnmente coordinan el átomo de zinc estructural en proteínas Fur y PerR (Figura 20), se ha descrito que una vez purificada, FurC mantiene fuertemente unido un átomo de zinc, incluso tras un primer paso de purificación en presencia de 10 mM de EDTA (apartado 4.1.1.2). En este caso, la fiabilidad de la predicción de AlphaFold de la región que contiene los residuos posiblemente involucrados en la coordinación del zinc en FurC es baja ( $pLDDT > 50$ ) y se muestra desordenada. Por el contrario, en el modelo de dímero de SWISS MODEL, el plegamiento que adopta esta región se acomoda a la arquitectura del sitio de unión al Zn estructural de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis* (Figura 31.C) permitiendo proponer a Cys103, Asp105, His144 y Asp147 como posibles residuos implicados en la coordinación del átomo de Zn fuertemente unido por FurC.

Por último, cabe mencionar que en los modelos de AlphaFold y SWISS-MODEL la Cys86 de cada monómero está localizada en una región muy flexible que conecta las láminas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  ubicadas en el dominio de unión a DNA. La distancia entre los C $\alpha$  de la Cys96 de cada monómero dentro del dímero es de 16,3 Å en el modelo de SWISS-MODEL y de 5,9 Å en el modelo de AlphaFold.

Dado que los experimentos de SEC-MALLS-RI evidenciaron la presencia en solución de tetrámeros de FurC, se realizó el modelado de una organización tetramérica con el objeto de estudiar la posible base molecular de la estabilización de tetrámeros y visualizar posibles puentes disulfuro que podrían formarse en respuesta a la oxidación. Para la predicción de un posible tetrámero de FurC se utilizó AlphaFold colab. El modelo coloreado con el criterio de fiabilidad de AlphaFold (Figura 29.D) reveló que en general el modelo muestra un nivel de confianza alto, concentrándose los valores más bajos de pLDDT en algunos residuos de los extremos C y N terminal como se observó también en la predicción del dímero, así como en la región entre los residuos 71-100, los cuales se piensa que están involucrados en la tetramerización de Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Perard et al., 2016) (Figura 29.E).



**Figura 32. Distancias entre los C $\alpha$  de las cisteínas en posición 86 en el modelo de tetrámero de FurC generado con AlphaFold colab.** Las distancias entre los residuos Cys86 entre monómero y monómero en una unidad dimérica se muestran con líneas discontinuas en verde y marrón. Las distancias entre los residuos Cys86 entre dímeros se muestran con líneas discontinuas en gris.

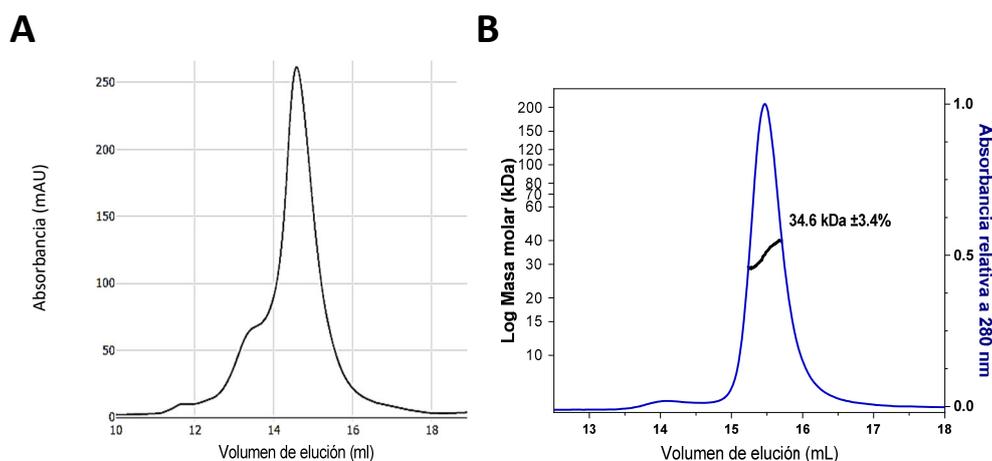
Como se muestra en la Figura 32, el residuo Cys86, aparece de nuevo como la única cisteína en una posición capaz de establecer puentes disulfuro entre subunidades de FurC. Cabe destacar que en este modelo la distancia entre las Cys86 de dos dímeros diferentes (5 y 9 Å) es claramente menor que la distancia equivalente entre las Cys86 del mismo dímero (16.9 y 17.1 Å) (Figura 32). No obstante, la región “bisagra” entre los dos dominios es altamente flexible. Esto hace que la posición de las cisteínas tanto entre monómeros en el dímero como entre dímeros en el tetrámero sea compatible con una posible formación de puentes disulfuro en respuesta a la oxidación. En conjunto, estos resultados están en concordancia con la capacidad de FurC de formar tetrámeros en solución en respuesta a la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o diamida (Figura 27, apartado 4.1.2.7). Es interesante destacar, que al contrario de lo observado para FurC, el servidor PISA no predice una organización tetramérica estable en solución u otros oligómeros de mayor peso molecular a partir de la estructura cristalográfica de PerR:Zn,Mn de *B. subtilis* aunque sí predice un dímero en solución. Por otro lado, utilizando los servidores AlphaFold colab y AlphaFold v2 no se consiguió modelar un tetrámero con la secuencia de PerR de *B. subtilis*.

#### 4.1.4. Cristalización de FurC y el complejo FurC-DNA

Durante el desarrollo de la tesis doctoral se planteó cristalizar la proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 para conocer su estructura tridimensional. Este objetivo se abordó inicialmente durante la estancia de investigación realizada en el laboratorio LCBM de Grenoble bajo la supervisión de la Dra. Isabelle Michaud-Soret donde se desarrolló el método para la purificación de FurC en un único estado oligomérico y se realizaron los primeros cribados para la cristalización de este regulador. Posteriormente, se continuó el trabajo en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) en colaboración con la Prof. Dra. Marta Martínez Júlvez, donde se realizaron nuevos cribados en diferentes condiciones para la cristalización de FurC y el complejo FurC-DNA y se optimizaron aquellas que dieron mejores resultados.

Tras comprobar que la forma dimérica de FurC se veía favorecida con la preincubación de FurC con un reductor y alta fuerza iónica antes de su separación por cromatografía de exclusión molecular (Figura 24, apartado 4.1.2.5), se ajustaron las condiciones para obtener FurC en cantidad y condiciones de tampón adecuados para abordar los ensayos de cristalización. Por un lado, se modificó ligeramente el tampón de equilibrado de la columna de cromatografía de exclusión molecular utilizado anteriormente (4.1.2.5). En este caso, se utilizó Tris-HCl 50 mM pH

7,5, NaCl 150 mM, 0,5 M TCEP. Este tampón no contiene glicerol e incluye el agente reductor TCEP que ayuda a mantener un ambiente reductor durante los ensayos de cristalización. Por otro lado, también se modificó la concentración de los reactivos utilizados para la preincubación de FurC previa a la cromatografía de exclusión molecular, aumentando las concentraciones de NaCl y DTT a 1 M y 4 mM, respectivamente. Como se observa en la prueba a menor escala de la Figura 33.A, estas condiciones también favorecieron la formación del pico obtenido en torno al volumen de elución del pico 2 mostrado en la Figura 24 del apartado 4.1.2.5 y que corresponde igualmente con la forma dimérica de FurC (Figura 33.B).

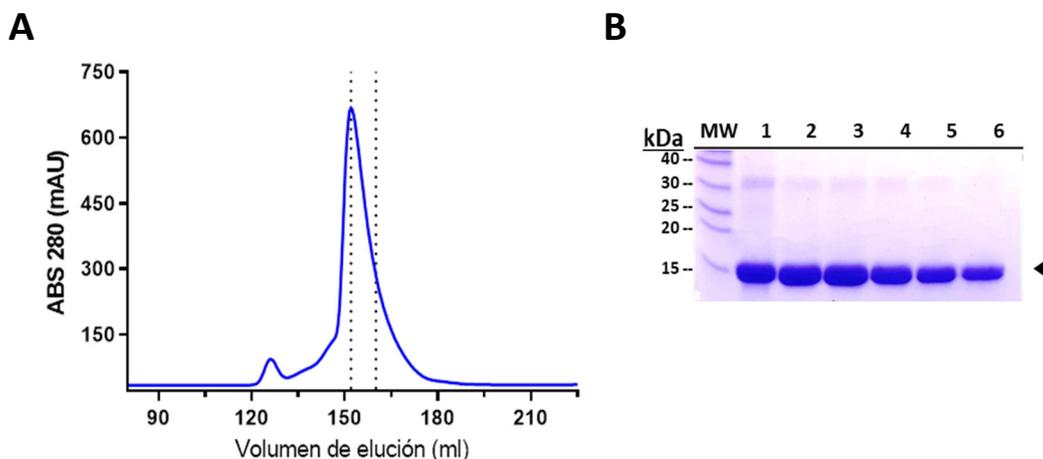


**Figura 33. Cromatografía de exclusión molecular a escala analítica y análisis de SEC-MALLS-RI para la prueba de condiciones de purificación de FurC para ensayos de cristalización.** A) Cromatografía de exclusión molecular de FurC en Superdex™ 200 Increase 10/300 equilibrada en Tris-HCL 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 0,5 mM. B) Análisis del peso molecular mediante SEC-MALLS-RI de FurC purificada mediante exclusión molecular. Se utilizó una columna Superdex™ 200 Increase 10/300 equilibrada en Tris-HCL 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 0,5 mM

Una vez optimizadas las condiciones de purificación en condiciones analíticas, se procedió a la purificación a escala preparativa del dímero de FurC como se describe en el apartado 3.5.2.6.2. La primera purificación de FurC en forma dimérica se realizó en una columna Superdex™ 75 16/600 durante la estancia en el LCBM Grenoble y posteriormente también se puso a punto en nuestro laboratorio utilizando una columna Superdex™ 26/600, obteniendo resultados reproducibles.

Con objeto de simplificar la presentación de resultados, a continuación, se muestran los resultados obtenidos en nuestro laboratorio. La proteína FurC previamente purificada mediante cromatografía de unión a heparina y DEAE-celulosa y dializada en Tris-HCL 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM (apartado 4.1.1.2) se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular. Para ello,

se incubó con 1 M NaCl durante 30 min y posteriormente con DTT durante 10 min para favorecer la conformación dimérica. El perfil cromatográfico y las alícuotas obtenidas de la purificación se muestran en la Figura 34.

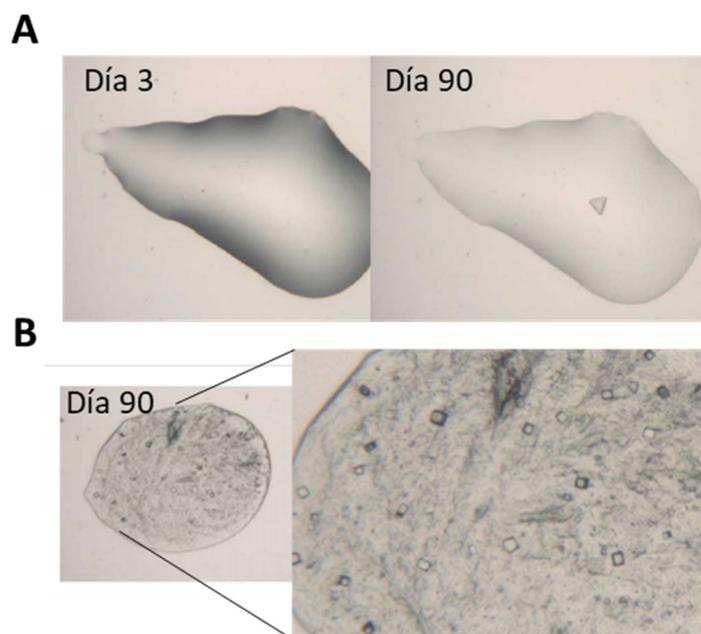


**Figura 34. Purificación de FurC mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex™ S75 26/600.** A) Perfil cromatográfico de la purificación. B) Gel SDS-PAGE 17 % de las alícuotas recogidas de la sección correspondiente a la fracción señalada en el cromatograma.

Las fracciones correspondientes con una mayor homogeneidad de FurC, a juzgar por el perfil de elución, se juntaron y concentraron de nuevo hasta lograr una concentración aproximada de 10 mg/mL. Seguidamente se prepararon alícuotas de la proteína y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En el laboratorio HTX Lab (<https://htxlab.embl.fr/>) del centro CEA-Grenoble, la fracción de FurC purificada a homogeneidad mediante exclusión molecular se concentró hasta 9 mg/mL en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 0,5 mM, se centrifugó 1 min a  $16500 \times g$  y con ella se realizaron los primeros ensayos automatizados de cristalización. En la Figura 35 se muestran 2 condiciones que dieron lugar a cristales de FurC en la primera aproximación.

Los cristales obtenidos en la condición “PEG 8000 10 %, Imidazol 0,1 M pH 8” se intentaron optimizar utilizando una preparación de FurC a 10 mg/mL y variando el % PEG 8000 entre 8-18 %. Además, se probó a añadir al líquido madre 1 mM  $\text{MnCl}_2$  y/o 5 mM  $\text{ZnSO}_4$  por ser estos los metales divalentes que coordina FurC (apartado 4.1.2.2 y 4.1.2.3) pero no se observó la aparición de cristales.



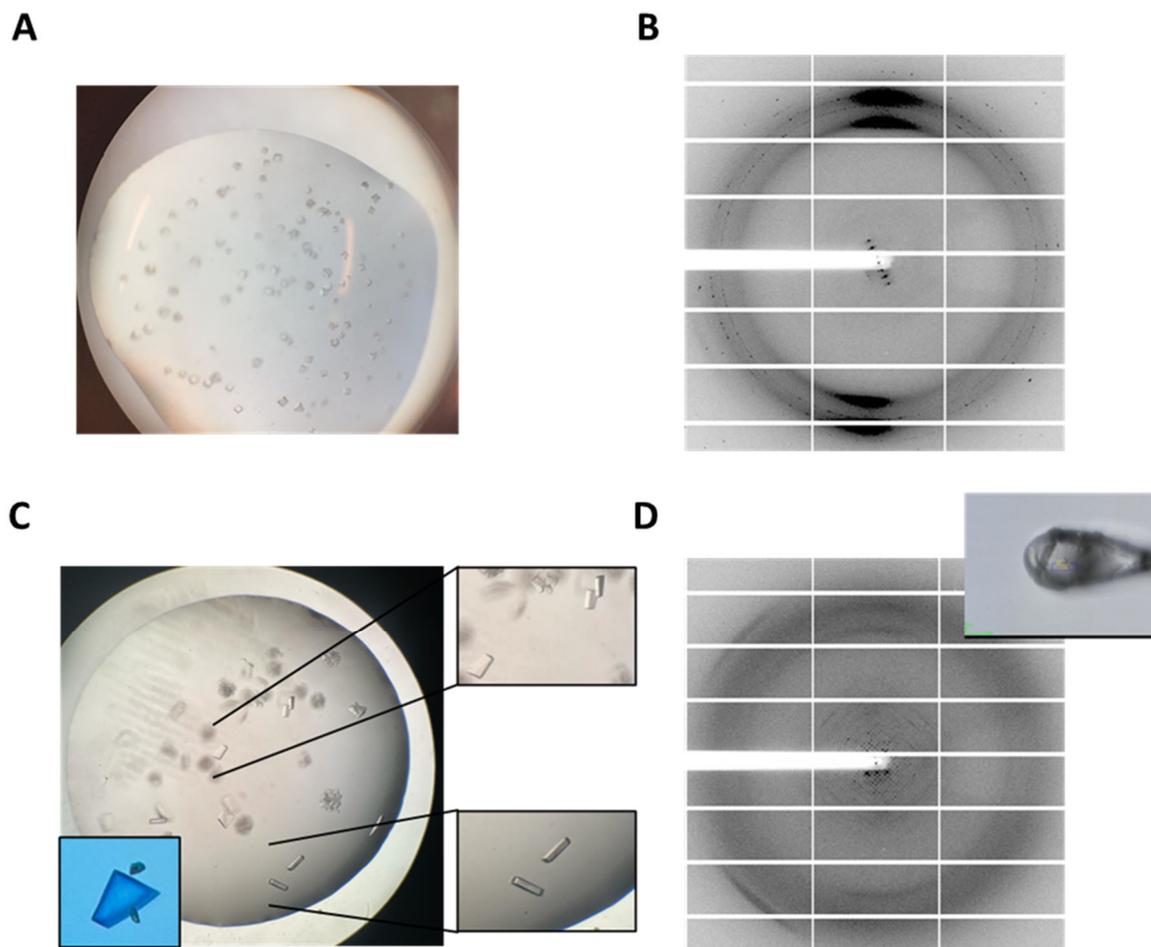
**Figura 35. Cristales obtenidos en la aproximación de cristalización de FurC (9 mg/mL) con las condiciones.** A) PEG 3500 20 %, Fluoruro de sodio 0,2 M, Bis-Tris propano pH 8,5. B) PEG 8000 10 %, Imidazol 0,1 M pH 8.

Los cristales obtenidos en la condición “PEG 8000 10 %, Imidazol 0,1 M pH 8” se intentaron optimizar utilizando una preparación de FurC a 10 mg/mL y variando el % PEG 8000 entre 8-18 %. Además, se probó a añadir al líquido madre 1 mM  $MnCl_2$  y/o 5 mM  $ZnSO_4$  por ser estos los metales divalentes que coordina FurC (apartado 4.1.2.2 y 4.1.2.3) pero no se observó la aparición de cristales.

Como nueva aproximación se planteó cocristalizar FurC con DNA, y así elucidar la estructura del complejo. Para ello, se realizaron pruebas de cristalización de FurC junto con un fragmento de DNA que contenía la secuencia de unión de 19 pb de FurC al promotor de *prxA* “CAAATCGTTATGACTATG”. La mezcla con el DNA se realizó en presencia de 1 mM  $MnCl_2$  y (10 mM de DTT o 1 mM TCEP) por ser las condiciones necesarias de FurC para unirse al DNA. Además, se realizó la misma incubación con la proteína sin DNA.

Como primera aproximación se realizó un cribado de cristalización de FurC en presencia de DNA y FurC sola (incubadas previamente con  $MnCl_2$  y DTT como se indica anteriormente) probando un total de 384 condiciones incluidas en los kits comerciales que se muestran en el apartado 3.8 y utilizando el método de difusión de vapor en gota sentada. Estas condiciones se probaron utilizando diferentes proporciones de volumen de proteína/líquido madre en la gota.

En la condición D9 del kit ProPlex “PEG 6000 15%, MPD 5 %, MES 0,1 M pH 6,5”, en proporción 1:1 y con FurC-DNA, aparecieron los cristales que se muestran en la Figura 36.A, los cuales difractaron dando el patrón que se muestra en la Figura 36.B.



**Figura 36. Cristales obtenidos con la fracción FurC-DNA y la condición “PEG 6000 15 %, MPD 5 %, MES 0,1 M pH 6,5”.** A) Primeros cristales obtenidos en gota sentada (0,5  $\mu$ L FurC-DNA, 0,5  $\mu$ L líquido madre) con previa incubación de FurC con DNA en presencia de  $\text{MnCl}_2$  1 mM y DTT 10 mM. B) Patrón de difracción obtenido a partir de un monocristal de la gota que se muestra en “(A)”. C) Cristales optimizados en gota colgante (1  $\mu$ L FurC-DNA, 1  $\mu$ L líquido madre) con previa incubación de FurC con e DNA en presencia de  $\text{MnCl}_2$  1 mM y TCEP 1 mM. A la derecha se muestran detalles con más aumento y abajo a la izquierda un cristal de la gota teñido específicamente con azul de Coomassie. D) Patrón de difracción obtenido a partir de un monocristal de la gota que se muestra en “(C)”. Arriba a la izquierda se muestra el cristal dentro del *loop* durante el experimento de difracción de rayos x.

Dicha condición se optimizó variando el porcentaje de PEG 6000 de 11-21 % y el rango de pH de 5-8, y además se utilizó el método de gota colgante. Posteriormente también se probó a sustituir DTT por TCEP en la incubación de la proteína con DNA, un reductor que es menos sensible a la oxidación. Entre todas las condiciones, ninguna variación en el % PEG o el pH del líquido madre resultó mejorar notablemente la formación de cristales en gota sentada (1  $\mu$ L de

volumen total), pero en gota colgante (1  $\mu\text{L}$  de volumen total) aparecieron cristales un poco más grandes que los obtenidos anteriormente con gota sentada a las 48 h. Estos cristales se formaron tanto con la proteína incubada con DNA en presencia de  $\text{MnCl}_2$  y DTT como en presencia de  $\text{MnCl}_2$  y TCEP. Sin embargo, los cristales obtenidos en presencia de DTT que se visualizaron a las 48 h se disolvieron a los 5 días, por lo que no pudieron ser recogidos para su difracción (hecho que se había observado también con la misma condición, pero en otros intentos con gota sentada). Los cristales obtenidos con la incubación con TCEP (obtenidos también tras 48 h) (Figura 36.A), fueron colectados a los 4 días sin signo de degradación y congelados para su difracción en las instalaciones de radiación sincrotrón ALBA (Barcelona). Los cristales difractaron a 20 Å (Figura 36.B), una resolución que resulta insuficiente para determinar la estructura de la proteína-DNA.

Es importante mencionar que los cristales no recolectados de la gota de la Figura 36.B, permanecieron estables tras un mes. Este hecho sugeriría que utilizar TCEP supone una mejora frente al DTT por ser un reductor más estable frente a la oxidación y por tanto más adecuado para que FurC se mantenga reducida más tiempo y pueda cristalizar de manera estable con el DNA. En vista de estos resultados y de la reactividad que FurC ha mostrado a la oxidación (apartados 4.1.2.5 a 4.1.2.7), en futuras aproximaciones la optimización de las condiciones de cristalización se dirigirá hacia la mejora de la estabilidad de la proteína frente a la oxidación, realizando, entre otros, ensayos de cristalización en condiciones anaerobias.

# Resultados

Capítulo II. Impacto de la sobreexpresión de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120: Implicación en la defensa frente a estrés oxidativo y relación con la fotosíntesis.



## 4.2. Capítulo II | Impacto de la sobreexpresión de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120: Implicación en la defensa frente a estrés oxidativo y relación con la fotosíntesis.

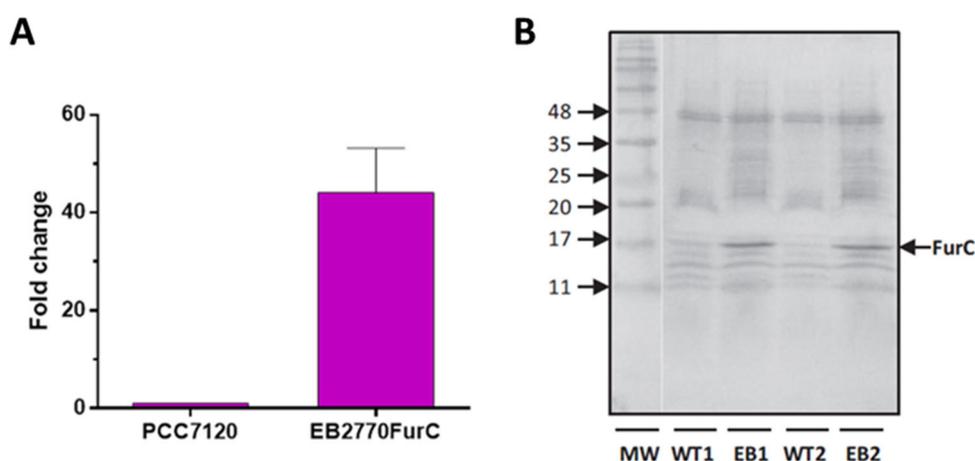
Estudios previos realizados con FurC sugirieron que ésta podía actuar como el regulador de respuesta a estrés por peróxido PerR en *Anabaena* sp. PCC7120. Esta propuesta se realizó en base a la inducción de FurC en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a su respuesta *in vitro* a la oxidación catalizada por metal cuando se evaluaba su unión a los promotores relacionados con el estrés oxidativo *srxA* y *prxA* (Lopez-Gomollon et al., 2009, Yingping et al., 2014). En la cianobacteria unicelular no diazotrófica *Synechocystis* sp. PCC6803 el regulador PerR está codificado por el gen *slr1738*. La interrupción de este gen permitió la identificación de un regulón que incluía aproximadamente 37 genes involucrados principalmente en la respuesta al estrés oxidativo, el transporte a través de las membranas, el metabolismo del hierro, y la concentración de CO<sub>2</sub> (Kobayashi et al. 2004, Li y col. 2004). Por el contrario, los intentos realizados en nuestro grupo y en otros laboratorios para lograr la inactivación del FurC no tuvieron éxito, sugiriendo que FurC podía tener una función adicional en cianobacterias fijadoras de nitrógeno o controlar un conjunto más amplio de genes en *Anabaena* sp. PCC7120 que en cianobacterias unicelulares (Yingping et al. 2014) (Sevilla et al., 2019). Por esta razón, como primera aproximación para el análisis funcional de la proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120, se llevó a cabo la caracterización fenotípica de un mutante de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) generado previamente en nuestro laboratorio.

El estudio del fenotipo de la estirpe EB2770FurC incluyó la determinación de parámetros de crecimiento y morfología de la cepa, así como análisis de las actividades fotosintética y respiratoria, y del contenido en pigmentos. Los resultados obtenidos se combinaron con ensayos de retardo en gel y análisis de la expresión génica mediante Real Time RT-PCR de un conjunto de genes potencialmente relacionados con los cambios fenotípicos observados en EB2770FurC al objeto de identificar posibles dianas directamente reguladas por FurC. Además, se estudió como afecta la sobreexpresión de *furC* a la tolerancia de la cianobacteria al estrés oxidativo y a la regulación de sus dianas en presencia o ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El conjunto de estos estudios permitió identificar nuevas dianas de FurC relacionadas con la defensa frente a estrés oxidativo, la fotosíntesis y la división celular.

#### 4.2.1. Caracterización fenotípica de EB2770FurC, una cepa que sobreexpresa FurC en *Anabaena* sp. PCC7120.

##### 4.2.1.1. Determinación de la sobreexpresión de FurC en la estirpe EB2770FurC.

Antes de proceder con la caracterización fenotípica se comprobaron los niveles de sobreexpresión de *furC* en la cepa EB2770FurC, construida previamente en nuestro laboratorio (Esther Broset, Trabajo de Máster). Para ello se compararon los niveles de mRNA de *furC* en la cepa EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre y se comprobó la expresión de la proteína mediante análisis de Western Blot. Como se observa en la Figura 37 ambas técnicas permitieron corroborar la sobreexpresión de FurC en EB2770FurC.

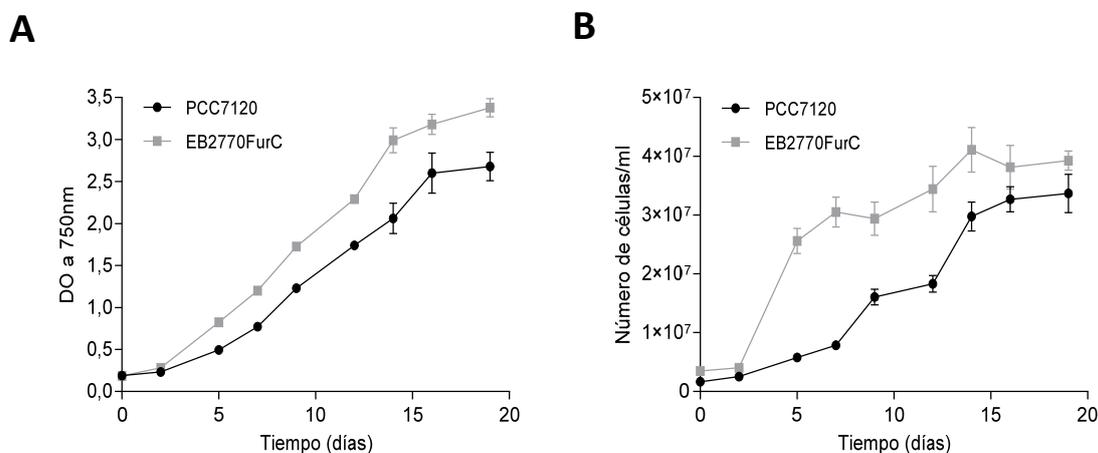


**Figura 37.** Niveles de transcripción y traducción de *furC* en la cepa EB2770FurC en comparación con la cepa silvestre *Anabaena* sp. PCC7120. A) Análisis de Real Time RT-PCR que muestran la abundancia del transcrito de *furC* en la cepa EB2770FurC y en *Anabaena* sp. PCC7120. Los valores se expresan como *fold change*; Se indica la desviación estándar correspondiente a tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. B) Detección mediante Western Blot de la proteína FurC en extractos crudos de *Anabaena* sp. PCC7120 (WT) y EB2770FurC (EB). Se ensayaron dos réplicas biológicas de cada cepa. La banda correspondiente a FurC se indica con una flecha.

##### 4.2.1.2. Crecimiento fotoautotrófico

La determinación del crecimiento fotoautotrófico de *Anabaena* sp. PCC7120 y de la cepa de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) en medio BG11 se comparó a través de medidas de la densidad óptica a 750 nm y del recuento de células en el transcurso de 20 días, como se describe en el apartado 3.11.1. La evolución de la densidad óptica y número de células de ambas estirpes a lo largo del tiempo se muestran en la Figura 38. Como se puede observar, tanto la evolución de la absorbancia a 750 nm, como el recuento de células indicaron que la tasa de crecimiento

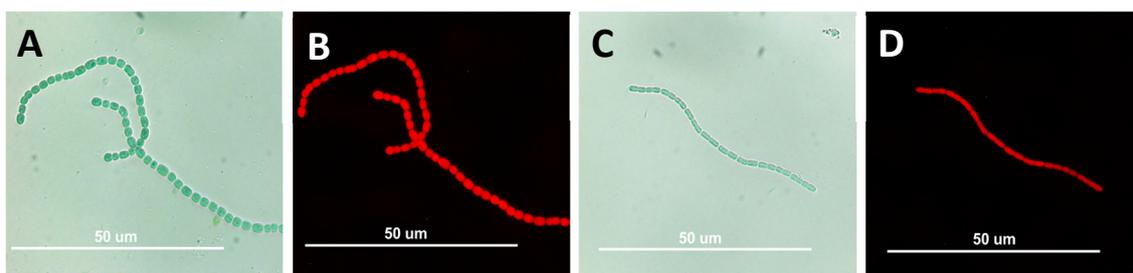
de EB2770FurC fue mayor que la observada para la cepa silvestre (Figura 38.A y 38.B). Mientras que *Anabaena* sp. PCC7120 mostró un tiempo de duplicación de  $5,54 \pm 0,2 \text{ d}^{-1}$  la variante EB2770FurC presentó un tiempo de duplicación de  $4,78 \pm 0,5 \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 38. Determinación del crecimiento de la cepa de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) en comparación con la cepa silvestre *Anabaena* sp. PCC7120.** Las medidas se determinaron como A) D.O. a 750 nm y B) número de células por mililitro. Los valores mostrados representan la media de 3 réplicas biológicas. La desviación estándar se representa por barras verticales.

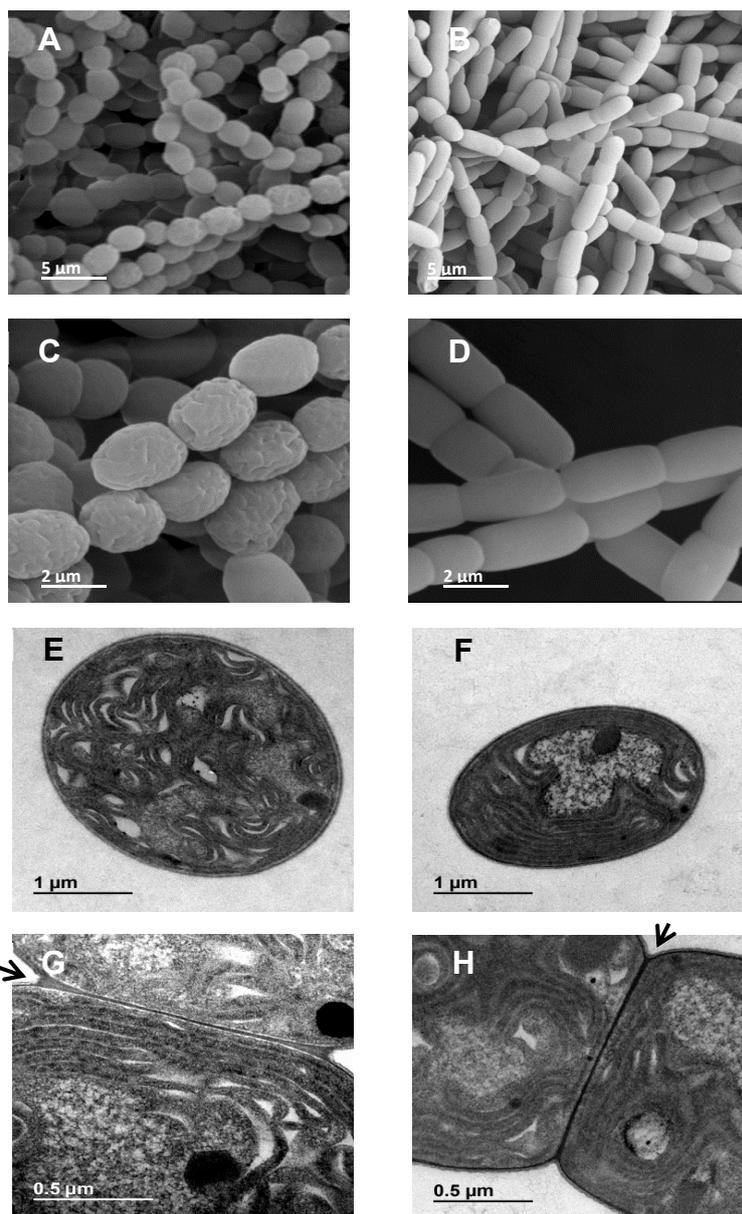
#### 4.2.1.3. Morfología celular y ultraestructura

Para observar posibles cambios en la morfología y ultraestructura de la cepa EB2770FurC se utilizaron técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica. En el microscopio óptico se apreció que las células de EB2770FurC (Figura 39.C, D) tenían menor tamaño que las de *Anabaena* sp. PCC7120 (Figura 39.A, B) y presentaban diferencias en su morfología celular, que se hicieron más evidentes en las observaciones con microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 40). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el patrón de fluorescencia a lo largo del filamento entre EB2770FurC y la cepa silvestre (Figura 39.B, D).



**Figura 49. Fotografías de microscopía óptica de campo claro (A, C) y de fluorescencia (B, D) de *Anabaena* sp. PCC7120 (A, B) y la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC (C, D).**

Las micrografías de SEM a menor aumento (3000x) mostraron que los filamentos de la cepa EB2770FurC están compuestos por células en forma de bacilo, mientras que las células del tipo silvestre tienen forma más redondeada (Figura 40.A, B). Además, los filamentos de EB2770FurC exhibieron células de forma y tamaño más homogéneas, en comparación con la cepa de tipo silvestre (Figura 40.A, B). Por otra parte, las micrografías de SEM tomadas a mayor aumento (7.000x) permitieron observar que la rugosidad de la superficie exhibida por el tipo silvestre disminuía considerablemente en la cepa EB2770FurC (Figura 40.C, D).

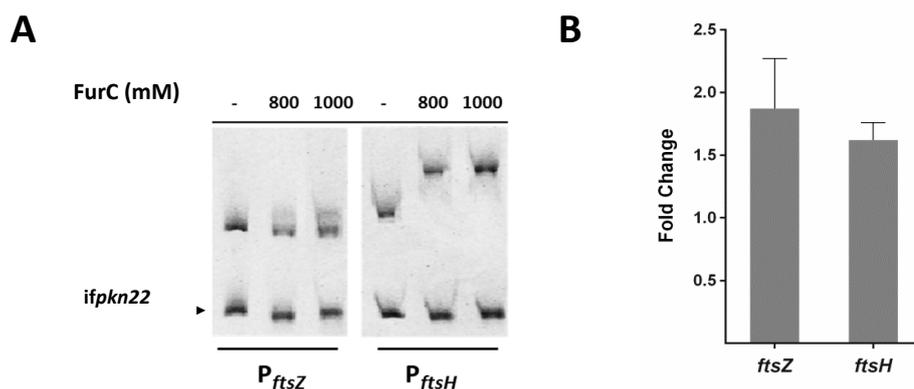


**Figura 40. Microscopía de SEM y TEM de células de la cepa silvestre *Anabaena* sp. PCC 7120 (A, C, E, G) y la cepa de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC (B, D, F, H) recogidas en la fase exponencial de crecimiento. SEM (A, B, C, D) y TEM (E, F, G, H). Cada microfotografía es representativa de al menos 10 imágenes diferentes de dos replicas biológicas.**

Para analizar los cambios en la ultraestructura de las células de EB2770FurC se utilizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la Figura 40.E, F se pueden observar diferencias en la disposición de tilacoides entre ambas cepas. En células de *Anabaena* sp. PCC7120 los tilacoides se distribuyeron homogéneamente en el citoplasma celular (Figura 40.E) mientras que en la cepa EB2770FurC se ubicaron cerca de la membrana plasmática, en la periferia de la célula (Figura 40.F). Además, se observó que las células de EB2770FurC tenían un diámetro más pequeño (Figura 40.F) en comparación con la cepa silvestre (Figura 40.E), confirmando lo observado por microscopía óptica.

Curiosamente, la variante de sobreexpresión de *furC* exhibió una capa de peptidoglicano más densa y una superficie más lisa que la cepa silvestre. Además, el septo intercelular de EB2770FurC parecía ser más ancho que el observado entre células de *Anabaena* sp. (Figuras 40.C, D, G, H). Finalmente, como se observa en la Figura 40. G, H, los ácidos pépticos o mucopolisacáridos que forman la vaina mucilaginoso de *Anabaena* parecían estar distribuidos de forma diferente en los extremos de los septos de ambas cepas. Como se discutirá más adelante, esto podría deberse a la alteración de los niveles de abundancia de proteínas relacionadas con la formación de la capa de peptidoglicano y de la biogénesis de membrana en la estirpe de sobreexpresión de *furC* (apartado 4.5.2).

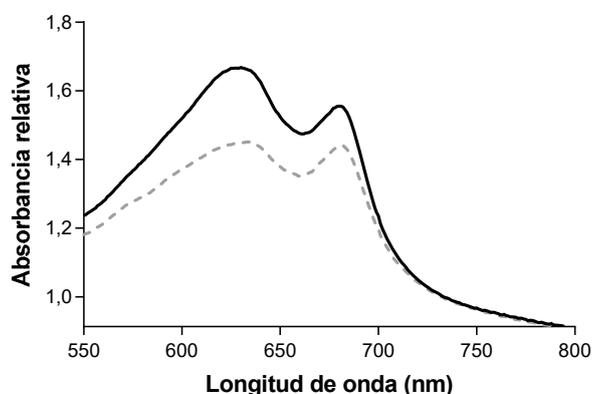
Debido a que la morfología y crecimiento de la cepa de sobreexpresión de *furC* estaban bastante afectados, se analizó la posible modulación directa por parte de FurC de la expresión de algunos genes relacionados con la morfología celular, como el operón *mreBCD*, que codifica las actinas MreB, MreC and MreD (Hu et al. 2007), o dos genes relacionados con cambios en la división celular como *ftsZ* y *ftsH* (*all4776*). Sin embargo, a pesar de que la nomenclatura para *ftsH* la clasificaba en las bases de datos como “cell division protein”, como se comentará más adelante, el gen *ftsH* está involucrado principalmente en procesos relacionados con el reciclaje del PSII. Inicialmente se estudió la unión *in vitro* de la proteína FurC a los promotores seleccionados mediante ensayos de retardo en gel. FurC fue capaz de unirse a las regiones promotoras de los genes *ftsZ* y *ftsH* (Figura 41.A). Por el contrario, no se observó unión al promotor de *mreBCD*.



**Figura 41. Estudio de la regulación por FurC de los genes de *ftsZ* y *ftsH*.** A) Ensayos de retardo en gel para el análisis de la unión *in vitro* de FurC con las regiones promotoras de *ftsZ* y *ftsH*. La unión de FurC al promotor *prxA* (panel izquierdo) se incluyó como control positivo. Los carriles incluyen fragmentos de DNA libres (-) o incubados con las concentraciones indicadas de FurC purificada (nM) En todos los ensayos se utilizaron MnCl<sub>2</sub> y DTT a una concentración de 100 μM y 1 mM respectivamente. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). B) Transcripción relativa de los genes *ftsZ* y *ftsH* determinada por Real Time RT-PCR en las células de EB2770FurC con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120. Los valores de cambio en la expresión se expresan como *fold change* y corresponden con la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

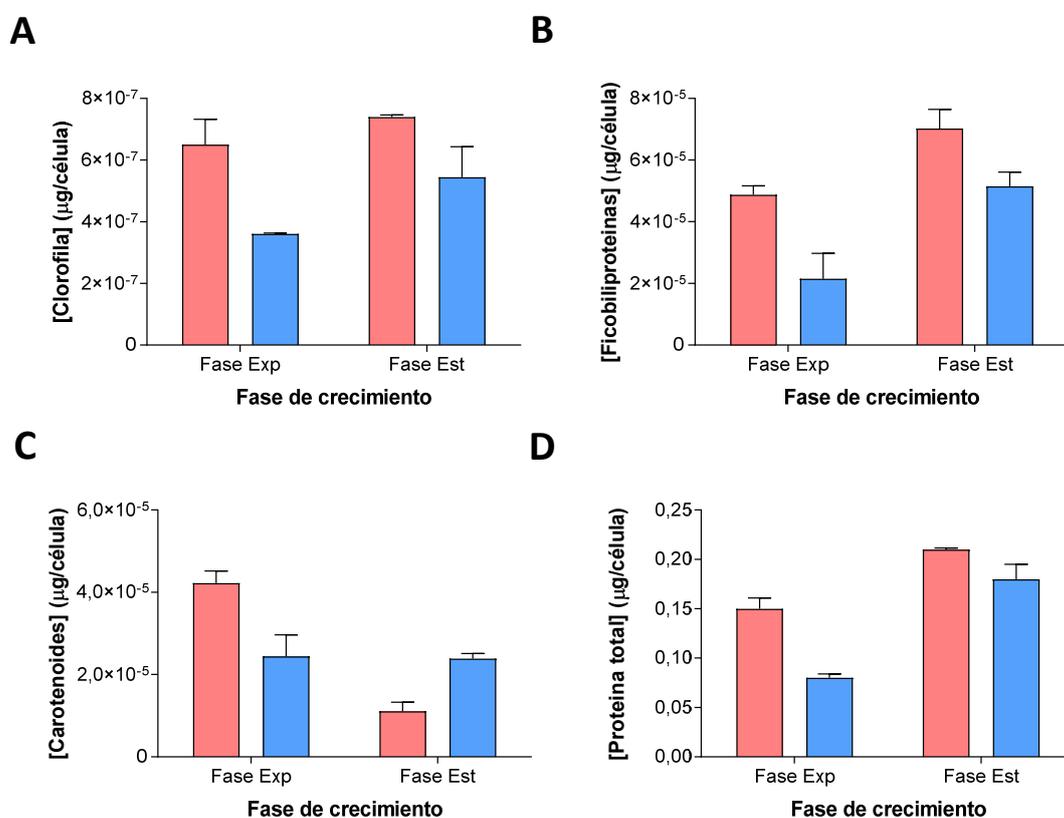
#### 4.2.1.4. Análisis de la composición en pigmentos fotosintéticos. Modulación de los genes relacionados con el ficobilisoma

Para un mayor conocimiento de las características fenotípicas del mutante de sobreexpresión de *furC* de *Anabaena* sp. PCC7120 se determinó su contenido en pigmentos. Inicialmente, se realizó un espectro de células completas de la cepa EB2770FurC y se comparó con el de la cepa *Anabaena* sp. PCC7120 (Figura 42). Esta comparativa mostró que la cantidad de ficobiliproteínas (máximo de absorbancia a 625 nm) y de clorofila *a* (máximo de absorbancia a 665 nm) era menor en la cepa EB2770FurC que en la cepa silvestre.



**Figura 42. Espectro de UV-visible de células enteras de *Anabaena* sp. PCC7120 (línea continua) y EB2770FurC (línea discontinua).** Los espectros se normalizaron a la misma densidad óptica a 750 nm.

Para poder valorar esta diferencia, se determinó el contenido en ficobiliproteínas, clorofila *a*, carotenoides y proteína total de ambas cepas en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Figura 43). Estos datos se normalizaron con respecto al número de células presentes en cada muestra.

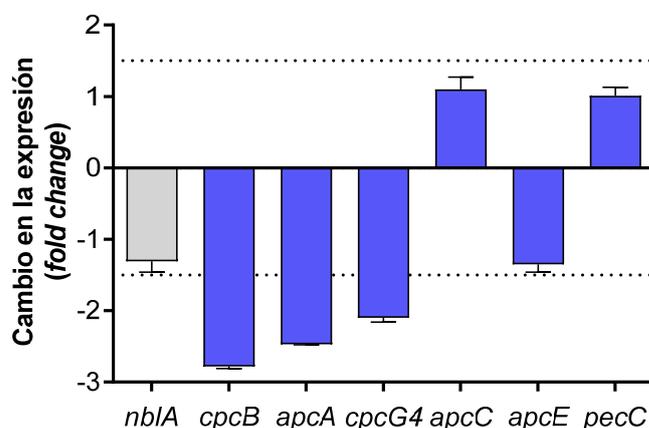


**Figura 43. Determinación del contenido en pigmentos y proteína total de *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC).** Se muestran los datos de *Anabaena* sp. PCC7120 (barras rosas) y EB2770FurC (barras azules) en las fases exponencial (Fase Exp) y estacionaria (Fase Est) de crecimiento. Determinación del contenido en clorofila *a* (A); ficobiliproteínas (B); proteínas totales (C) y carotenoides (D). Los resultados se expresaron normalizados con respecto al número de células.

Como se observa en la Figura 43, los niveles de clorofila *a*, ficobiliproteínas y proteína total fueron significativamente menores en la cepa EB2770FurC con respecto a la silvestre, tanto en fase exponencial como estacionaria (Figura 43.A, B, D). Sin embargo, el contenido en carotenoides era menor en EB2770FurC en la fase exponencial pero mayor en la fase estacionaria con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 (Figura 43.E).

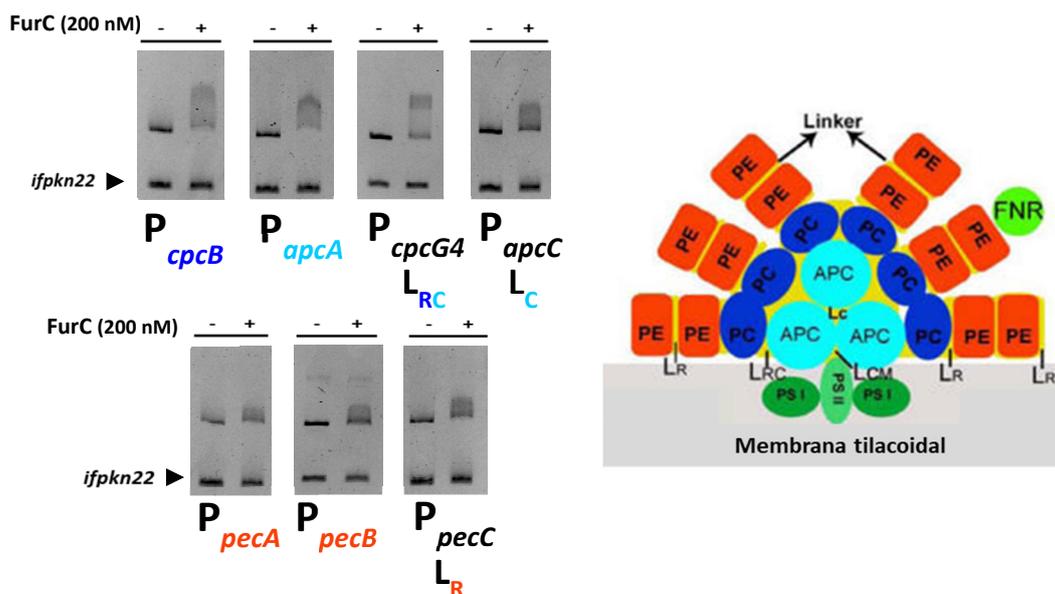
En base a la disminución observada en el contenido en ficobiliproteínas, se decidió estudiar tanto los niveles de expresión del gen *nblA*, proteína involucrada en la degradación del ficobilisoma, como los niveles de expresión de una selección de genes que codifican algunas de las subunidades y *linkers* que componen el ficobilisoma. Como se muestra en la Figura 44, no se

observó un aumento en la expresión de *nblA* que pudiera relacionarse con la disminución del contenido en ficobiliproteínas. Sin embargo, sí que se observaron cambios en los niveles de expresión de los genes de las siguientes subunidades y linkers del ficobilisoma: *apcA*, *cpcB*, y *cpcG4*, cuya expresión cambió hasta -2,8 veces para el caso de *cpcB*.



**Figura 44.** Cambios relativos en los niveles de transcripción de genes que codifican diferentes subunidades y *linkers* del ficobilisoma en la cepa EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre. Transcripción relativa de los genes *cpcB*, *apcA*, *cpcG4*, *apcC*, *apcE* y *pecC* determinada por Real Time RT-PCR. Los valores del cambio en la expresión se expresan como *fold change* y corresponden con la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

Para averiguar si existía una regulación directa de estos genes mediada por FurC, se analizó mediante ensayos de retardo en gel la unión de FurC a los promotores de los genes que codifican las subunidades CpcB, ApcA, PecB, PecA y los *linker* CpcG4, ApcC y PecC. Inicialmente, en este trabajo se observó que FurC no era capaz de unirse *in vitro* a ninguno de los promotores de estudio (Sevilla et al., 2019). Sin embargo, a lo largo de esta Tesis doctoral, y tras optimizar las condiciones para los ensayos de unión de FurC a sus dianas transcripcionales (apartado 3.9, Materiales y métodos), se observó que FurC era capaz de formar complejo con los promotores de los genes *cpcB*, *apcA*, *cpcG4* y con menos afinidad al promotor del *linker* ApcC. El gen *cpcB* es el primero del operón *cpc* que codifica varias subunidades de ficocianina; *apcA* corresponde al primer gen del operón *apcABC* que codifica las subunidades de aloficocianina; el *linker* CpcG4 une las subunidades de la ficocianina con aloficocianina y ApcC conecta el núcleo de aloficocianinas. Estos resultados confirmaban que el cambio en la transcripción de estos genes que se observa en EB2770FurC (Figura 44) se debe probablemente a una regulación directa por parte de FurC, de lo que se puede inferir la importancia del papel de FurC en la regulación de la composición del ficobilisoma y por extensión en la fotosíntesis.



**Figura 45. Ensayos de retardo en gel para el estudio de la unión de FurC a los promotores de los genes que codifican diferentes subunidades y linkers del ficobilisoma.** Los carriles (-) que corresponden al control (sin proteína) y los carriles (+) contienen 200 nM de FurC purificada. En todos los casos se emplearon MnCl<sub>2</sub> y DTT a concentración final de 100 μM y 1 mM respectivamente. Se añadieron 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en el gel y el tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). El color de cada gen de estudio indica a qué subunidad del ficobilisoma, indicadas en el diagrama de la derecha, pertenece la proteína que codifican. Ficoeritrinas (PE, rojo), Ficocianinas (PC, azul oscuro), Aloficiocianinas (APC, azul claro). La letra L indica que se trata de un *linker* del ficobilisoma que conecta las diferentes subunidades de ficoeritrina y ficocianina (LR), las subunidades de ficocianina con núcleo de aloficiocianinas (LRC) o conecta las subunidades del aloficiocianinas (LCM, LC).

**4.2.1.5. Determinación de la tasa neta de fotosíntesis y tasa respiratoria. Evaluación de la eficiencia fotosintética**

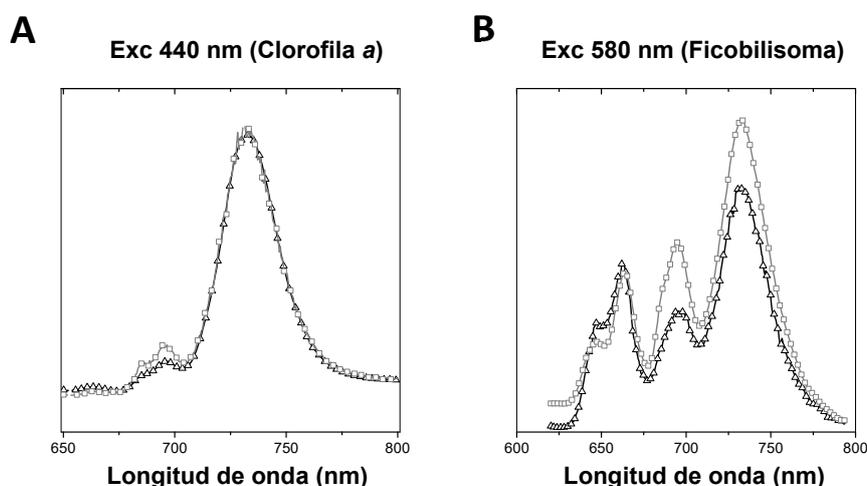
En base al fenotipo observado para la variante EB2770FurC, que mostraba menor cantidad de pigmentos fotosintéticos que la estirpe silvestre, se evaluó el impacto de la sobreexpresión de *furC* en el proceso de fotosíntesis y respiración. Para ello se realizaron medidas de la actividad fotosintética neta y la actividad respiratoria en fase exponencial temprana del cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Actividades fotosintética neta y respiratoria de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC.** Los resultados son la media de tres determinaciones ± desviación estándar y expresados como pmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> millón de células<sup>-1</sup>.

	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	EB2770FurC
<b>Tasa neta fotosíntesis</b>	21,05 ± 3,08	7,5 ± 2,19
<b>Tasa respiración</b>	0,97 ± 0,26	1,97 ± 0,15

Como se observa en la Tabla 11, el valor de la tasa fotosintética neta en la cepa de sobreexpresión de *furC* fue solamente un 30% del determinado en *Anabaena* sp. PCC7120. Esta reducción de la fotosíntesis es coherente con la disminución del contenido en pigmentos observada previamente (ficobiliproteínas y clorofila *a*; Figura 43) y, como se verá más adelante, con la disminución de la cantidad de la proteína D1, componente principal en el PSII (Figura 47). Por otro lado, el valor de la tasa de respiración de la cepa de sobreexpresión de *furC* fue el doble que el calculado en la estirpe silvestre.

Para evaluar la influencia de la sobreexpresión de FurC en la eficiencia de transferencia de energía a ambos fotosistemas desde los complejos captadores de luz (clorofila *a* o ficobilisomas) se utilizó la espectroscopía de fluorescencia a 77 K. La eficiencia de transferencia de energía desde los fotosistemas a la clorofila *a* se estudió excitando las células con una longitud de onda de 440 nm. En este caso, la fluorescencia de emisión obtenida en el rango de longitud de onda entre 680-695 nm, que corresponde al PSII, fue mayor en la estirpe EB2770FurC, indicando que la sobreexpresión de *furC* está asociada a una menor eficiencia en la transferencia de energía entre el PSII y la clorofila *a* (Figura 46.A)



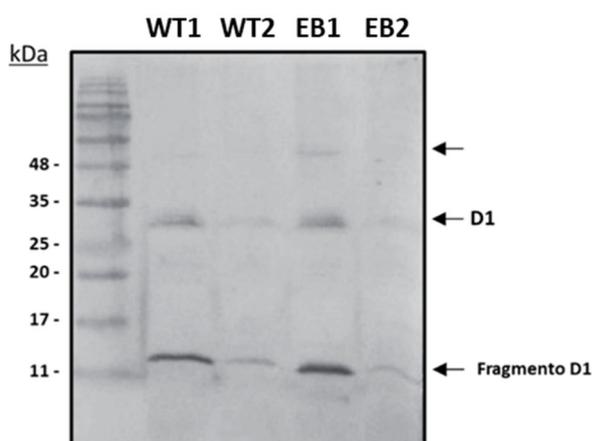
**Figura 46. Espectros de emisión de fluorescencia a 77K de las células de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC recogidas en la fase exponencial de crecimiento.** Se muestran los espectros de *Anabaena* sp. PCC7120 (triángulos negros) y EB2770FurC (cuadrados grises). A) Espectros de emisión excitados a 440 nm para monitorizar la transferencia de energía de los fotosistemas a la clorofila *a*. Los espectros se normalizaron a una concentración idéntica de clorofila *a* en ambas cepas. B) Espectros de emisión excitados a 580 nm para comprobar la transferencia de energía del ficobilisoma a la clorofila *a*. En este caso, los espectros se normalizaron a concentraciones idénticas de ficobiliproteínas en ambas cepas. Los espectros presentados son representativos de dos experimentos por separado.

Cuando las células se excitaron a 580 nm (longitud de onda absorbida por diferentes componentes del ficobilisoma), se observó un comportamiento similar al anterior, pero mucho más acusado. Los picos de mayor intensidad en el espectro de las células de EB2770FurC que

aparecen a 695 y 730 nm, correspondientes a la emisión de la antena del PSII y a la clorofila *a* asociada al PSI respectivamente, indican una menor eficiencia en la transferencia de energía desde los ficobilisomas hacia ambos fotosistemas (Figura 46.B). Estos resultados concuerdan con la baja tasa fotosintética observada en la cepa EB2770FurC en comparación con la cepa silvestre (Tabla 11).

#### 4.2.1.6. Análisis de los niveles del polipéptido D1 del PSII.

Durante el proceso de fotooxidación los niveles del polipéptido D1 presentes en el PSII son controlados principalmente por acción de la proteasa FtsH. Inicialmente, se estudió la regulación por parte de FurC del gen *ftsH* por su interés como proteína potencialmente involucrada en la división celular (Wehrli et al., 2000), ya que este gen se había anotado en las bases de datos como “cell división protein”. Sin embargo, se ha demostrado que en cianobacterias la proteína FtsH actúa como una metaloproteasa involucrada en el proceso de reciclaje del PSII degradando el polipéptido D1 (Kato & Sakamoto, 2018, Malnoë et al., 2014).



**Figura 47. Detección de la proteína D1 mediante Western Blot en extractos proteicos de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC.** Se utilizaron dos réplicas biológicas de *Anabaena* sp. PCC7120 (WT1 y WT2) y de EB2770FurC (EB1 y EB2). Las bandas correspondientes con la proteína D1 se indican con una flecha.

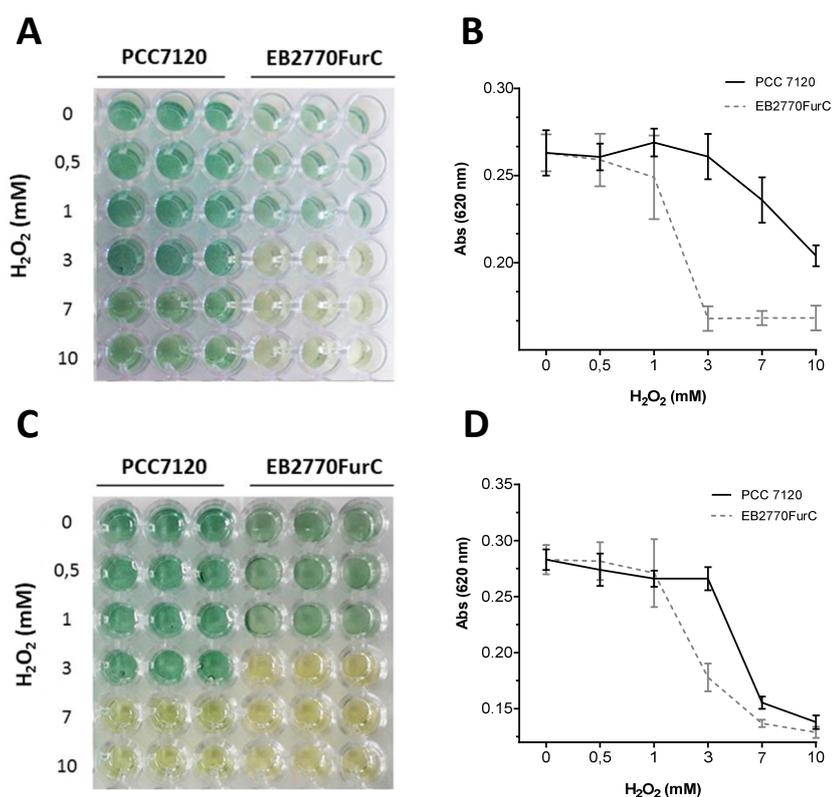
Puesto que FurC regulaba directamente a *ftsH*, activando su expresión y se había encontrado que la estirpe EB2770FurC presentaba menor eficiencia fotosintética, se compararon los niveles de polipéptido D1 en las cepas de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC. Para ello se realizaron análisis de Western que confirmaron que la cantidad total de D1 era menor en las células de EB2770FurC que en la estirpe silvestre (Figura 47). La Figura 47 muestra que ambas cepas muestran una banda a 32 kDa que corresponde con la forma nativa de D1 y el péptido procesado a 14 kDa.

### 4.2.2. Implicación de FurC en la respuesta frente a estrés oxidativo

Dado que FurC se había descrito como el regulador de estrés por peróxido PerR en *Anabaena* sp PCC7120, uno de los principales objetivos dentro de la caracterización fisiológica fue analizar en mayor profundidad la implicación de FurC en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo. Para ello se analizó la tolerancia de la variante EB2770FurC al estrés oxidativo y se midieron las actividades catalasa y superóxido dismutasa en extractos crudos de las cepas EB2770FurC y silvestre. Además, se estudió la regulación ejercida por FurC en la expresión de nuevas dianas relacionadas con el estrés oxidativo y se evaluó la modulación de la expresión de éstas tras la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la estirpe de sobreexpresión de *furC*.

#### 4.2.2.1. Tolerancia de la cepa EB2770FurC al estrés oxidativo.

Con objeto de comparar la tolerancia al estrés oxidativo de las cepas de *Anabaena* PCC7120 y la cepa de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC, se analizó el efecto de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio de cultivo (Figura 48).

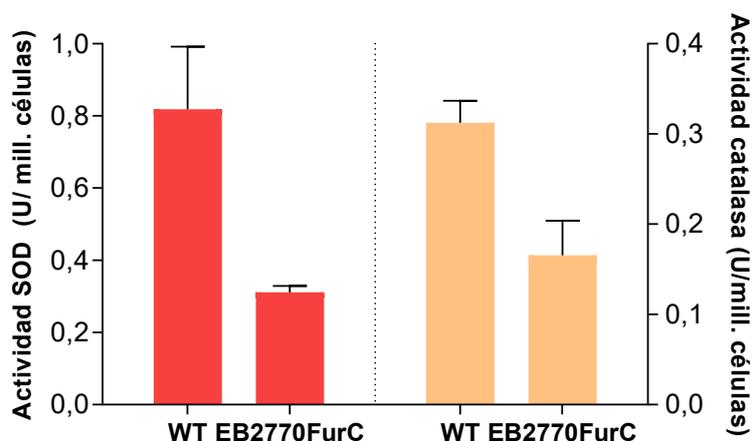


**Figura 48. Ensayo de la tolerancia de las estirpes *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC al estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC en fase exponencial tardía de crecimiento (D.O. a 750 nm = 1), se lavaron y ajustaron a una densidad óptica a 750 nm de 0,4. 200 µL de cada cultivo por triplicado se incubaron con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h (A, B) y 48 h (C, D) en oscuridad. La estimación de la clorosis se documentó mediante fotografía (A, C) y por la lectura de la absorbancia a 620 nm en un lector de placas (B, D).

Los cultivos se trataron como se indica en la sección 3.11.6. La Figura 48.A muestra que la cepa EB2770FurC experimenta una menor supervivencia tras 24 h de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mM (Figura 48.A, B), mientras que la cepa silvestre no se ve afectada hasta concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superiores a 7 mM, incluso tras 24 y 48 h de exposición (Figura 48.C, D).

#### 4.2.2.2. Actividades catalasa y superóxido dismutasa en la estirpe EB2770FurC.

Con el fin de conocer las posibles causas de la menor tolerancia al estrés oxidativo observada en la cepa EB2770FurC, se determinaron las actividades catalasa y superóxido dismutasa (SOD) que están estrechamente relacionadas con la respuesta a ROS. *Anabaena* sp. PCC7120 posee dos enzimas con actividad catalasa, las Mn-catalasas: *catA* y *catB* y dos enzimas con actividad superóxido dismutasa, *sodA* y *sodB*. Estas medidas de actividad no disciernen la actividad de cada proteína, sino que se obtiene la actividad resultante total de las dos enzimas responsables de la actividad en cada caso. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la Figura 49.

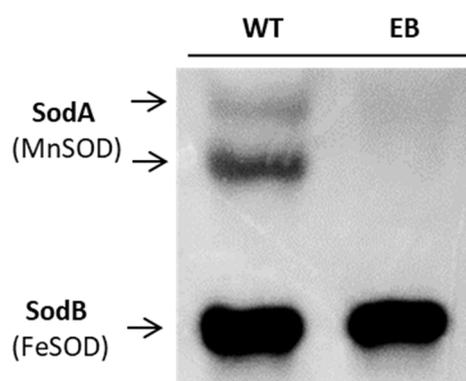


**Figura 49. Determinación de las actividades SOD (izquierda) y catalasa (derecha) de las cepas *Anabaena* sp. PCC7120 (WT) y EB2770FurC.** Los resultados se normalizaron con respecto al valor de número de células determinado antes de la extracción proteica.

Como se puede observar en la Figura 49, la estirpe EB2770FurC presentó una menor actividad tanto superóxido dismutasa como catalasa. La actividad catalasa por célula medida para la cepa EB2770FurC fue en torno al 50 % de la observada en la cepa silvestre. A su vez, la actividad SOD en las células de EB2770FurC fue aproximadamente un 40 % de la observada para la estirpe silvestre. La disminución de estas dos actividades tan importantes en la defensa contra el estrés oxidativo en la cepa de sobreexpresión de *furC* parece ser coherente con la menor

tolerancia de dicha cepa al estrés oxidativo, aunque no se podría descartar que fuera debida a otros factores.

Por otra parte, se realizó un ensayo en gel para valorar la actividad de las dos enzimas superóxido dismutasa (SodA o MnSOD y SodB o FeSOD) presentes en *Anabaena* sp. PCC7120. Mediante la detección espectrofotométrica de la actividad global en extractos crudos, es imposible saber si la disminución observada de la actividad SOD podía estar causada por la alteración de *sodA*, *sodB* o ambas enzimas. Sin embargo, gracias a su diferencia en tamaño y la posibilidad de la tinción específica de estas enzimas, es posible realizar el análisis de la actividad de cada enzima por separado mediante la separación en gel nativo de poliacrilamida y su posterior tinción. Como se observa en Figura 50, la actividad de SodA (MnSOD) no se pudo detectar en la cepa de sobreexpresión de *furC*, mientras que en la estirpe silvestre se detectó la actividad tanto de SodA como de SodB.



**Figura 50. Gel de tinción específica de la actividad SOD de las cepas *Anabaena* sp. PCC7120 (WT) y EB2770FurC (EB).** Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína mezclados con 3  $\mu$ L de tampón del tampón carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 30 % y azul de bromofenol 0,25 % (p/v)) y sin hervir en un gel PAGE 8 %. Con flechas se indican las bandas correspondientes a MnSOD (SodA) y FeSOD (SodB)

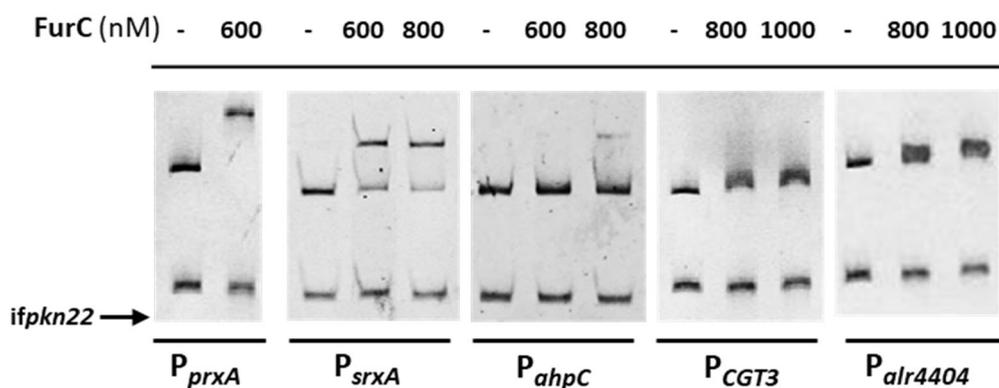
Cabe mencionar que esta diferencia en la actividad SodA observada entre EB2770FurC y la estirpe silvestre no fue correlativa con el nivel de expresión de *sodA* en ambas cepas (Figura 52 (apartado 4.2.2.3)). Como se comentará más adelante, la expresión de *sodA* no sólo no disminuyó a consecuencia de la sobreexpresión de *furC*, sino que aumentó hasta 2 veces.

#### 4.2.2.3. Regulación transcripcional de los genes de respuesta a estrés oxidativo

Las diferencias observadas en la tolerancia al  $H_2O_2$  en la cepa EB2770FurC, así como la posible función de FurC como regulador PerR, nos llevaron a analizar la regulación por FurC de una serie de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo. Para ello, se evaluó la unión

específica de FurC a las regiones promotoras de dichos genes mediante ensayos de retardo en gel (Figura 51) y a continuación se realizó un análisis transcripcional mediante Real Time RT-PCR (Figura 52).

En *Anabaena*, se ha sugerido que la primera barrera para la detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son las peroxirredoxinas, al contrario de lo que ocurre en la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC6803 u otros organismos procariontas cuya actividad predominante es la de la catalasa (Pascual et al., 2011). Por ello, además de estudiar la modulación por parte de FurC de los genes de Mn-catalasa *catA* y la Mn-SOD (*sodA*) cuya actividad se había visto modificada en EB2770FurC, se analizó la regulación de los siguientes genes que codifican varias peroxirredoxinas: *prxA* (*alr4641*), *ahpC* (*all1541*), *alr4404*, *GCT3* (*alr2375*), *GCT1* (*alr3183*) y *alr2503*). Además, se incluyó el gen de la sulfirredoxina (*srxA*), enzima relacionada con la respuesta a estrés oxidativo que ya se había descrito como diana directa de FurC (Yingping et al., 2014).

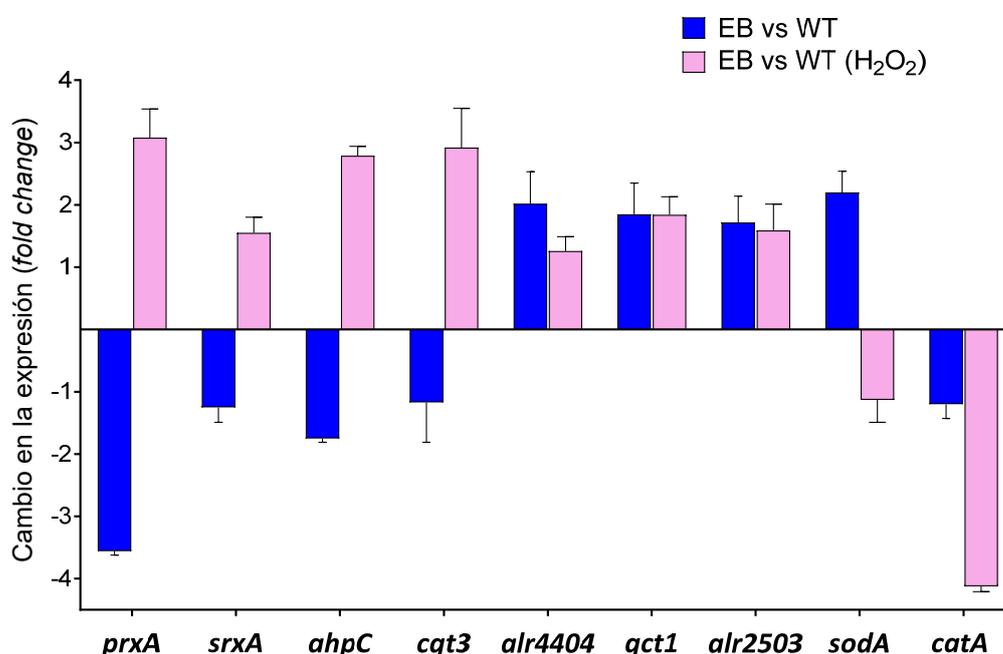


**Figura 51. Análisis de la interacción de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 con las regiones promotoras de *prxA*, *srxA*, *ahpC*, *CGT3* y *alr4404* mediante ensayos de retardo en gel.** Se muestran fragmentos de DNA libres (-) o incubados con concentraciones crecientes de FurC purificada (nM). En todos los casos se emplearon MnCl<sub>2</sub> y DTT a concentración final de 100 μM y 1 mM respectivamente. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*).

Como se observa en la Figura 51, además de las dianas descritas previamente, *prxA* y *srxA* (Yingping et al. 2014), los ensayos de retardo en gel mostraron que FurC fue capaz de unirse a la región promotora del gen *all1541*, que codifica una peroxirredoxina de tipo Cys Prx-s atípicas y el cual se denominó *ahpC* por ser el ortólogo a *ahpC*, diana canónica de la proteína PerR en *B. subtilis*. Por otro lado, aunque con menor afinidad, FurC también se unió a los promotores de la peroxirredoxina CGT3 y de *alr4404*, otra alkyl hydroperoxidoxina de *Anabaena* sp. PCC7120

con menor similitud con la *ahpC* de *B. subtilis*. Sin embargo, no se observó que FurC se uniera a los demás promotores estudiados (*CGT1*, *catA* y *sodA*).

A continuación, se cuantificó la transcripción relativa de estos genes en presencia y ausencia de 250 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la cepa EB2770FurC en comparación con la cepa silvestre. Como muestra la Figura 52, tras 1 h después de la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 μM, la expresión de los genes controlados directamente por FurC, incluyendo *prxA*, *srxA*, *ahpC* y *CGT3* fue mayor en la estirpe EB2770FurC que en la estirpe silvestre. Sin embargo, los niveles de transcripción en condiciones estándar fueron similares a los de la cepa silvestre (*srxA* y *CGT3*) o incluso menores (*prxA* y *ahpC*).



**Figura 52.** Transcripción relativa en EB2770FurC (EB) con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 (WT) determinada por Real Time RT-PCR de las peroxirredoxinas de *Anabaena* sp. PCC7120, *srxA*, *sodA* y *catA* y su respuesta transcripcional al estrés oxidativo generado por la incubación con 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h. Los valores de cambio en la expresión se expresan como *fold change* y corresponden con la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

Cabe destacar que el gen *alr4404* mostró un patrón inverso de expresión en la estirpe EB2770FurC, incrementando su expresión en condiciones estándar y no mostrando cambio en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugiriendo que en este caso FurC podría estar actuando como activador de esta peroxirredoxina. La expresión de los genes correspondientes a las otras peroxirredoxinas, *CGT1* y *alr2503* aumentó alrededor de 1,7 veces en la cepa EB2770FurC, tanto en condiciones estándar como de estrés oxidativo. Al no tratarse de dianas directas de FurC, se podría sugerir

que existe una regulación indirecta por parte de FurC, que además no sería dependiente del estado oxidativo de la célula. La transcripción de la *sodA* se incrementó en EB2770FurC en condiciones estándar alrededor de 2,5 veces, mientras que en condiciones de estrés oxidativo se mantuvo similar a los valores observados en la cepa silvestre. En el caso de la Mn-catalasa *catA*, no se observaron diferencias en la transcripción de la estirpe EB2770FurC y la cepa silvestre en condiciones estándar. Sin embargo, al incubar las cianobacterias con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los niveles de *catA* disminuyeron dramáticamente hasta 4 veces en la cepa EB2770FurC. Ya que no se observó una regulación directa por parte de FurC de los promotores de *sodA* y de *catA*, los cambios transcripcionales observados en diferentes condiciones podrían deberse a (1) una regulación indirecta por parte de FurC que parece dependiente del estado oxidativo de la célula, y que sería por el momento desconocida., (2) posibles efectos pleiotrópicos generados por la desregulación de las peroxirredoxinas u otras dianas directas de FurC. De hecho, es interesante observar como la actividad catalasa y superóxido dismutasa disminuía en condiciones estándar en el mutante EB2770FurC, como es el claro ejemplo de la isoforma SodA, cuya actividad no se detectaba en la variante EB2770FurC (Figura 50). Sin embargo, los niveles de mRNA de ambas enzimas o no cambiaron en la estirpe EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre, o incluso aumentaron como en el caso de SodA (Figura 52). En conjunto, todos estos resultados corroboran que FurC participa en la modulación de diversas proteínas implicadas en la respuesta concertada al estrés oxidativo en *Anabaena* sp. PCC7120.

# Resultados

**Capítulo III | FurC/PerR, un regulador versátil involucrado en la regulación de la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno.**



### **4.3. Capítulo III | FurC/PerR, un regulador versátil involucrado en la regulación de la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno.**

Como se comentaba anteriormente, intentos previos de nuestro laboratorio y de otros laboratorios (Yingping et al., 2014) por generar un mutante de delección de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120 fracasaron por lo que la proteína FurC se consideró esencial para la bacteria. Dado que su ortólogo *perR* en *Synechocystis* sp. PCC6803 no resultó ser un gen esencial, se propuso que FurC en *Anabaena* sp. PCC7120 podía estar regulando a un grupo más amplio de genes involucrados en procesos más allá de los canónicos de PerR. De hecho, durante la caracterización fenotípica de la cepa de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC, ésta mostró alteraciones muy relevantes en condiciones de deficiencia de nitrógeno en comparación con la WT, siendo incapaz de formar heterocistos. Estos hechos motivaron a nuestro grupo de investigación a estudiar la posible implicación de la proteína FurC en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

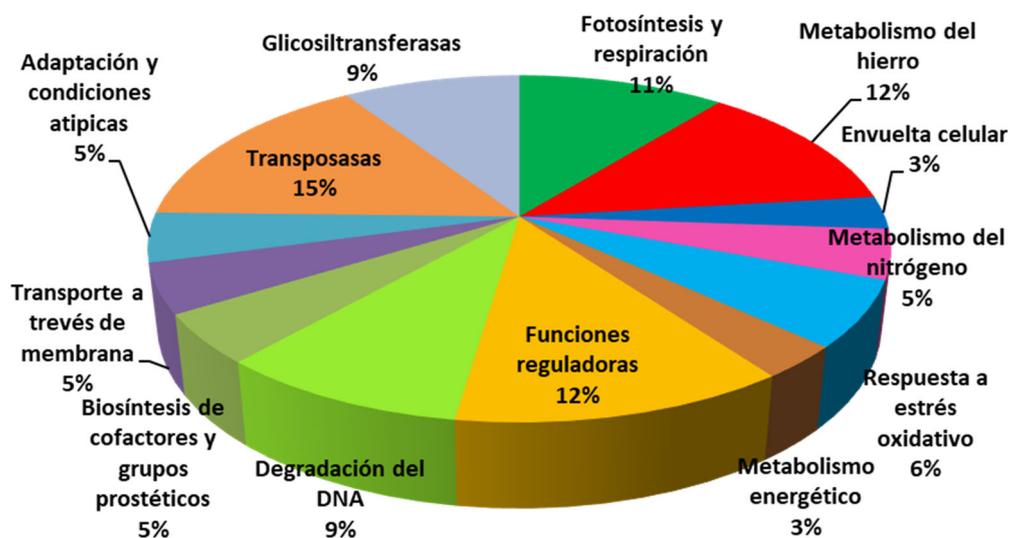
La respuesta a la deficiencia de nitrógeno en cianobacterias está fundamentalmente mediada por la proteína NtcA, un regulador transcripcional global que activa o reprime genes implicados en la asimilación de nitrógeno en función de la disponibilidad de este. Es de destacar que estudios previos mostraron que NtcA presentaba un sitio de unión en la región promotora de FurC (Lopez-Gomollon et al., 2007), hecho que también sugería una potencial implicación de FurC en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

Con el objetivo de estudiar el papel de FurC en el metabolismo de *Anabaena* sp. PCC7120 y en particular en el metabolismo nitrogenado y la diferenciación del heterocisto, se analizó mediante RNA-seq el perfil transcripcional de la estirpe EB2770FurC en comparación con el de *Anabaena* sp. PCC7120 tanto en condiciones estándar de cultivo como tras 48 h en condiciones de deficiencia de nitrógeno (-NO<sub>3</sub>). Los datos obtenidos se validaron mediante estudios de Real-Time RT-PCR y ensayos de EMSA para verificar la regulación directa por FurC de las nuevas dianas.

#### **4.3.1. Perfil transcriptómico de la estirpe EB2770FurC frente a *Anabaena* sp. PCC7120.**

El RNA fue extraído de cultivos de las cepas EB2770FurC y *Anabaena* sp. PCC7120 en fase exponencial de crecimiento con una D.O. a 750 de entre 0,6-0,7 y posteriormente fue purificado y analizado por RNA-seq. Para el análisis se evaluaron dos replicas biológicas de cada una de las

cepas. En condiciones estándar, los resultados mostraron que la sobreexpresión *furC* modificó los niveles de RNA mensajero de 197 genes por encima  $\pm 1,5 \text{ Log}_2$  (*fold change*) ( $p\text{-value} < 0,05$ ), lo que corresponde a un valor de *fold change* de  $\pm 2,8$ . Del total de genes que cambiaban su expresión, 75 estaban anotados con funciones conocidas y fueron clasificados en diferentes categorías funcionales (Tabla suplementaria S2 y Figura 53). Los genes anotados como proteínas hipotéticas se muestran en la Tabla suplementaria S4. En la Figura 53 se agrupan en categorías los genes con función conocida que cambiaban su expresión en la cepa EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre, con un cambio por encima de  $\pm 1,5 \text{ Log}_2$  (*fold change*) ( $p\text{-value} < 0,05$ ).



**Figura 53. Diagrama de las categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en la cepa de sobreexpresión de *furC*.** La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>) y la información disponible en la bibliografía.

Como se observa en la Figura 53, destacaba el número de genes implicados en las categorías funcionales de fotosíntesis y respiración (11 %), metabolismo del hierro (12 %) y funciones reguladoras (12 %). Entre estos genes se incluían algunos genes con especial relevancia en la fotosíntesis como son *psaI*, *psbK*, *psbX*, que codifican subunidades estructurales de los PSI y PSII, además de dos genes *psbA* (*psbAIV* y *psbAII*) que codifican dos isoformas de la proteína D1 del centro de reacción del PSII. Como se comentaba anteriormente, estas isoformas forman parte de un complejo proceso de reciclaje del PSII, donde participa la metaloproteasa FtsH, que es capaz de degradarlas en respuesta a su fotooxidación (Kato & Sakamoto, 2018, Malnoë et al., 2014). Así mismo, también se vio reducida la expresión del gen *wcaG*, un gen involucrado en la biosíntesis carotenoides (35).

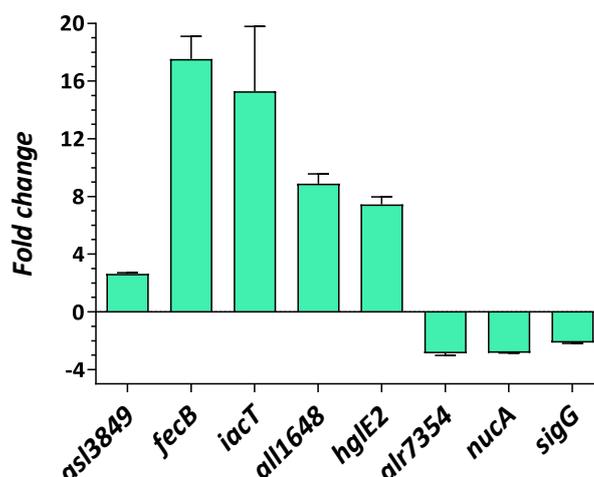
Por otro lado, el 12 % de genes desregulados en la cepa EB2770FurC pertenecían a la categoría del metabolismo del hierro. Entre ellos, se encuentran los genes que forman el sistema Fec y codifican las proteínas FecB, FecD3 y FecE3, implicadas en la absorción y el transporte de dicitrato férrico (Stevanovic et al., 2012), así como los genes que codifican dos proteínas que participan en el transporte de hierro llamadas IacT y SchE (Nicolaisen et al., 2010b). También se vieron alterados los niveles de mRNA en la cepa EB2770FurC de proteínas involucradas en el metabolismo nitrogenado como el factor sigma *sigG* y dos proteínas similares a nitrilohidratasa (All2027 y All2026).

Además como era de esperar, algunos genes que codifican proteínas implicadas en procesos de estrés oxidativo y detoxificación mostraron su expresión alterada. Entre ellos, la peroxiredoxina A, PrxA, diana conocida de FurC (Yingping et al., 2014), una glutatión S-transferasa, un citocromo P450 y una oxidorreductasa.

Interesantemente, dentro de la categoría de metabolismo energético, los niveles de mRNA de una succinil-CoA sintetasa y una 6-fosfofructoquinasa incrementaron notablemente en la estirpe de sobreexpresión de *furC*, así como seis genes descritos como glicosiltransferasas que también presentaron mayores niveles de transcripción en la cepa EB2770FurC. En lo relativo a genes con funciones reguladoras, varios genes que codifican para reguladores transcripcionales o para sistemas de dos componentes y serina/treonina quinasa estaban desregulados en la cepa EB2770FurC. Por último, los niveles de mRNA de la endonucleasa no específica *nucA* y su inhibidor NuiA (Meiss et al., 2000, Muro-Pastor et al., 1997) aparecieron reprimidos en la cepa EB2770FurC.

#### **4.3.1.1. Validación de los datos obtenidos por RNA-seq.**

Para validar los resultados obtenidos mediante RNA-seq, se analizó mediante Real Time RT-PCR la expresión de siete genes seleccionados pertenecientes a diferentes categorías funcionales en la cepa EB2770FurC en relación con la silvestre (Figura 55). Estos genes fueron *asl3849*, *fecB*, *iacT*, *all1648*, *alr7354*, *nucA* y *sigG*. Como se observa en la Figura 2, el perfil transcripcional de estos genes concordaba con los datos de RNA-seq (Tabla suplementaria S2) en todos los casos.



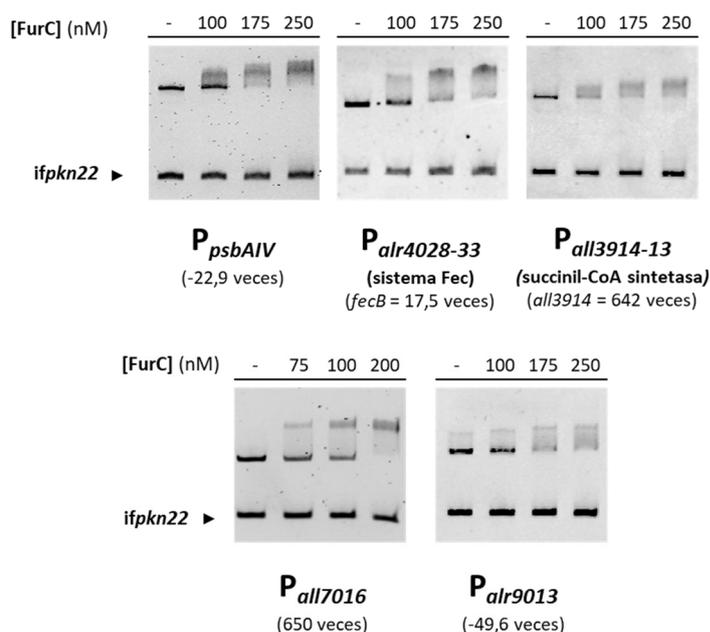
**Figura 54. Validación de los datos obtenidos por RNA-seq mediante Real Time RT-PCR.** Transcripción relativa de los genes *asl3849*, *fecB*, *iacT*, *all1648*, *alr7354*, *nuca* y *sigG*. determinada por Real Time RT-PCR. Los valores de cambio en la expresión se expresan como *fold change* y corresponden con la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

#### 4.3.1.2. Análisis de la regulación directa mediada por FurC de las nuevas posibles dianas.

De los resultados obtenidos por RNA-seq en condiciones estándar, se seleccionaron 17 genes de interés cuya expresión estaba alterada en la estirpe EB2770FurC, para testar la unión de FurC a sus promotores y por tanto evaluar si eran realmente dianas directas de FurC.

En la Tabla suplementaria S2 se indican los genes que fueron positivos (+) en los ensayos de EMSA (genes regulados directamente por FurC) o negativos (-) (genes regulados indirectamente por FurC). Los ensayos de EMSA que presentaron resultados positivos se muestran en la Figura 54. Como se puede observar, FurC fue capaz de unirse al promotor del operón *alr4028-33* que incluye genes que constituyen el sistema Fec, que como se ha indicado previamente está implicado en la absorción y transporte de dicitrato férrico.

FurC también fue capaz de formar complejo con el promotor del operón que comprende los genes *all3913* y *all3914* que codifican las subunidades alfa y beta de la enzima succinil-CoA sintetasa de *Anabaena* sp. PCC7120 respectivamente. Esta enzima cataliza la conversión de succinil-CoA en succinato en el ciclo Krebs. También se observó la unión de FurC a los promotores de dos genes con funciones reguladoras como son el regulador transcripcional *all7016* y el regulador de respuesta *alr9013*, ambos con funciones desconocidas (Figura 57).

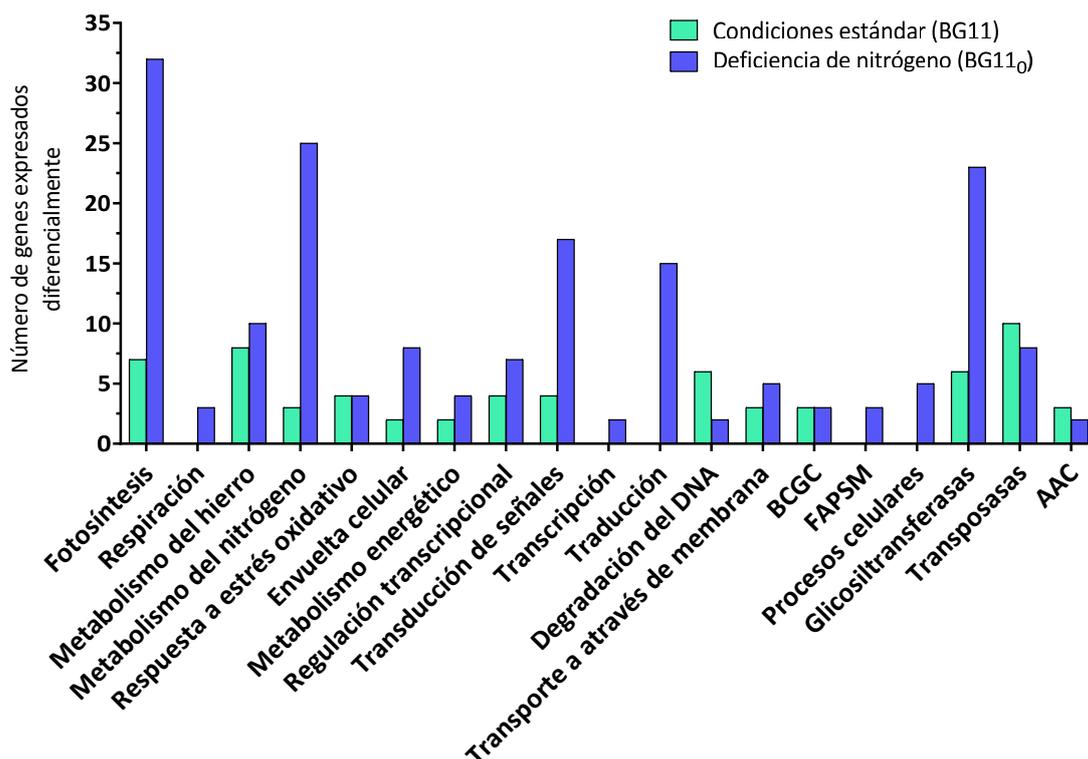


**Figura 55. Ensayos de retardo en gel que confirman la unión de FurC a los promotores de los genes *psbAIV*, los operones *alr4028-33* y *all3914-13*, *all7016* y *alr9013*.** Los carriles de cada gel incluyen fragmentos de DNA libres (-) o incubados con las concentraciones indicadas de FurC recombinante (nM). En todos los casos se emplearon MnCl<sub>2</sub> y DTT a concentración final de 100 μM y 1 mM respectivamente. Además, se añadieron 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en el gel y tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). Se muestra el cambio en la expresión (*fold change*) de cada gen en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120, determinado mediante Real Time RT-PCR o en su defecto mediante RNA-seq (indicado con un \*).

#### 4.3.2. Perfil transcripcional de la estirpe EB2770FurC y *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Como se comentaba anteriormente, FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 presentó un sitio de unión a NtcA en su promotor, lo que sugirió su implicación en el metabolismo del nitrógeno (Lopez-Gomollon et al., 2007). Además, las primeras observaciones del fenotipo de la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, revelaron su incapacidad para formar heterocistos (apartado 4.3.3.1). Ambos indicios motivaron el estudio en detalle de la implicación de FurC en el metabolismo del nitrógeno. Para ello, se realizó un análisis transcriptómico de la estirpe EB2770FurC comparado con la cepa silvestre tras 48 h de deficiencia de nitrógeno. Los cultivos en ausencia de nitrógeno se prepararon como se describe en Materiales y métodos y se comenzaron al mismo tiempo que los utilizados para la transcriptómica en condiciones estándar (BG11) (apartado 4.3.1) para poder comparar ambos transcriptomas. El perfil transcriptómico de la cepa EB2770FurC frente al de la cepa silvestre tras

48 h de deficiencia de nitrógeno reveló un total de 506 genes cuya expresión estaba alterada por encima del umbral de  $\pm 1,5 \text{ Log}_2 \text{ fold change}$ , equivalente a un valor de *fold change* de  $\pm 2,8$ , y con un *p-value* < 0,05. Entre ellos, 210 genes con función conocida se clasificaron en diferentes categorías funcionales (Tabla suplementaria S3 y Figura 56) y 296 genes se anotaron como proteínas hipotéticas (Tabla suplementaria S5).



**Figura 56. Anotación funcional de los genes expresados diferencialmente en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar de cultivo (azul claro) y tras 48 h de deficiencia de nitrógeno (azul oscuro).** La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>) y la información disponible en la bibliografía. BCGC: Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos; FAPSM: Metabolismo de esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos; AAC: Adaptación y condiciones atípicas. B. Diagramas de los genes diferencialmente expresados con función conocida en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120.

Cuando se llevó a cabo la comparación entre el número de genes diferencialmente expresados en EB2770FurC y la cepa silvestre en ambas condiciones, se observó cómo el número de genes que cambiaban en condiciones de deficiencia de nitrógeno (506) respecto a suficiencia (197) era significativamente mayor, de lo que se podía inferir que FurC podía jugar un papel importante en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Además, un alto porcentaje de genes que mostró expresión alterada en deficiencia de nitrógeno, no lo hizo en condiciones estándar (Figura 56). El análisis de los genes diferencialmente expresados en la cepa EB2770FurC frente

a la cepa WT en condiciones de deficiencia de nitrógeno indicó que los genes relacionados con la fotosíntesis se encontraban notablemente afectados. Varios genes que codifican tanto proteínas del PSI (PsaL, PsaJ, PsaX, PsaC) como del PSII (PsbAIV, PsbAII, PsbO, PsbAIII, PsbL) y 3 genes implicados en la biosíntesis de carotenoides y clorofila cambiaron su expresión en la cepa EB2770FurC. Además, 18 genes que codifican proteínas estructurales del ficobilisoma estaban desregulados, de los cuales los genes que comprenden el operón *apcABC* de alofococianina, el operón *cpc* de ficocianina y el *linker cpcG4*, ya se consideraban dianas directas de FurC (Tabla suplementaria S3).

Como ocurría en condiciones estándar, los niveles de mRNA de algunas proteínas relacionadas con la absorción de hierro mostraron una expresión alterada en EB2770FurC, como es el caso del operón *alr4028-33* que incluye proteínas del sistema Fec y la proteína SchE, un transportador involucrado en la secreción de sideróforos. Además de estos genes, en la cepa EB2770FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno cambiaba la expresión de otros genes implicados en el transporte de hierro como son *futA* y *futC* y de dos genes *all1100* y *all2609* que codifican proteínas periplásmicas de unión a dicitrato férrico.

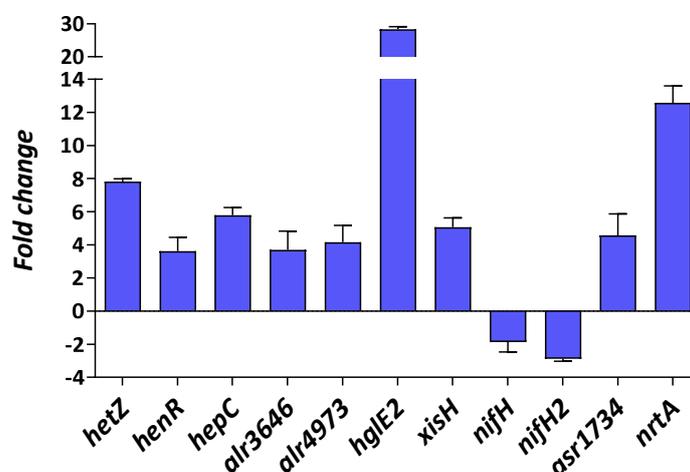
En el resto de las categorías, cabe destacar el elevado número de genes diferencialmente expresados que presentan funciones reguladoras, comprendiendo reguladores transcripcionales y mayoritariamente proteínas que componen sistemas de dos componentes y serina/treonina quinasas. Además, 23 glicosiltransferasas exhibieron niveles de transcripción alterados en la cepa EB2770FurC, estando todos regulados positivamente.

Como se ha comentado anteriormente, la categoría del metabolismo del nitrógeno y diferenciación de heterocistos se vio notablemente afectada, cambiando su expresión genes que codifican proteínas similares a nitrilo hidratasas (*All2026* y *All2027*) y genes que se incluyen en el operón *nirA-nrtABCD* que es responsable del importe de nitrato a la célula. En primer lugar, se observaron cambios en la transcripción de diversos genes relacionados directamente con el proceso de diferenciación del heterocisto. Estos genes fueron: *hepC* (glicosiltransferasa de la síntesis de la capa HEP), dos operones *devBCA* (*alr4973-4975* y *alr3647-3649*) relacionados con la deposición de polisacáridos en la capa HGL del heterocisto, *hglE2* (una potencial glicolípido sintasa del heterocisto), *henR* (regulador de respuesta que modula la deposición de polisacáridos), *hetZ* (regulador transcripcional en el desarrollo de heterocistos), *sigC* (factor sigma implicado en la diferenciación de heterocistos) y finalmente *asr1734* (regulador negativo del desarrollo de heterocistos). En segundo lugar, dentro de la categoría de fijación de nitrógeno,

genes relacionados con la fijación de nitrógeno en el heterocisto como la nitrogenasa reductasa *nifH2*, y dos genes llamados *xisH* y *xisI* que están implicados en la escisión del DNA para la correcta expresión del complejo de la nitrogenasa mostraron alterada su expresión. Finalmente, la expresión de *rbrA*, una rubreritina presente en el heterocisto responsable de proteger a la nitrogenasa frente ROS también estaba desregulada en la cepa EB2770FurC.

#### 4.3.2.1. Análisis de la expresión de dianas relacionadas con el metabolismo de nitrógeno en la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC.

Debido al alto número de genes que cambiaban su expresión y la potencial relevancia de FurC en la modulación del metabolismo nitrogenado, el análisis de la expresión por Real Time RT-PCR y los ensayos de EMSA posteriores se centraron en las categorías de Metabolismo de nitrógeno y diferenciación de heterocistos. De esta manera, se seleccionaron algunos genes que mostraban funciones clave en la regulación del metabolismo de nitrógeno (*hetZ*, *henR*, *hepC*, *alr3646*, *alr4973*, *hglE2*, *xisH*, *nifH2*, *asr1734* and *nrtA*) para analizar su expresión mediante Real-Time RT-PCR. Como se puede observar, los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 57, están en concordancia con los resultados obtenidos por RNA-seq.



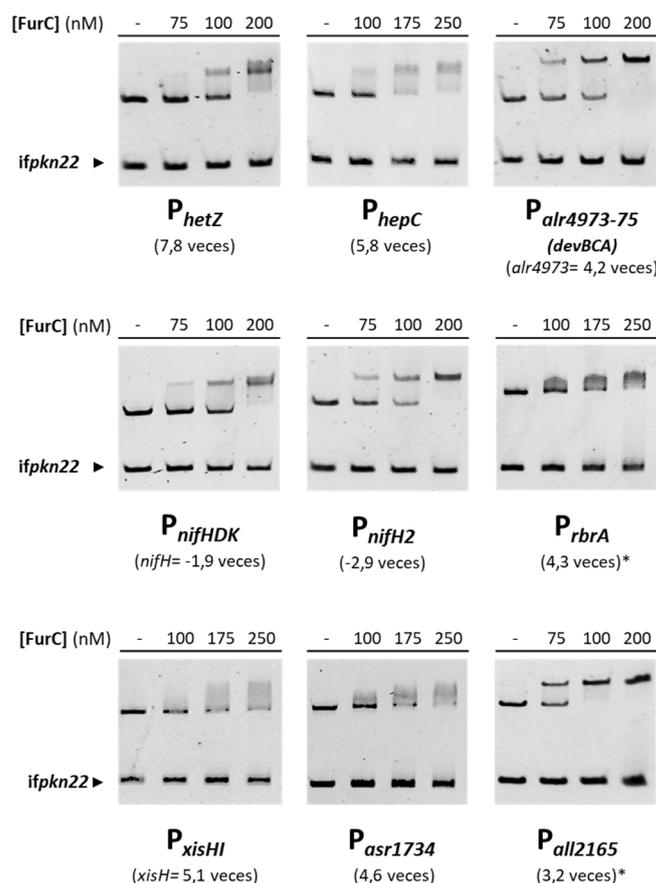
**Figura 57.** Transcripción relativa de los genes *hetZ*, *henR*, *hepC*, *alr3646*, *alr4973*, *hglE2*, *xisH*, *nifH*, *nifH2*, *asr1734* y *nrtA* determinada por Real Time RT-PCR. Los valores de cambio en la expresión se expresan como *fold change* y corresponden con la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

De hecho, la mayoría de los genes del metabolismo del nitrógeno mostraron un incremento en su expresión en la estirpe EB2770FurC con respecto a la cepa silvestre en condiciones de deficiencia de nitrógeno lo que sugería que, como se había descrito en el capítulo anterior, FurC podría tener un papel como activador transcripcional. Concretamente, *hetZ* aumentó 7,8 veces, *henR* 3,6 veces, *hepC* 5,8 veces, *alr3646* 3,7 veces, *alr4973* 4,2 veces, *hglE2* 28,4 veces *xisH* 5,1

veces, *asr1734* 4,6 veces y *nrtA* 12,6 veces. Sin embargo, el gen *nifH2* estaba reprimido -3 veces en la cepa EB2770FurC.

**4.3.2.2. FurC regula directamente la transcripción de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y la diferenciación de heterocistos.**

Para comprobar si los genes que mostraban diferencias transcripcionales en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 eran dianas directas de FurC, se realizaron ensayos de retardo en gel. Estos ensayos se llevaron a cabo con las regiones promotoras de los 15 genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y el desarrollo del heterocisto que mostraron cambios en los niveles relativos de transcripción. Los resultados se muestran en la Figura 58 y en la Tabla suplementaria S3.



**Figura 58. Ensayos de retardo en gel FurC con promotores de los genes relacionados con la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno.** Los carriles de cada gel incluyen fragmentos de DNA libres (-) o mezclados con las concentraciones indicadas de FurC recombinante (nM). En todos los casos se emplearon MnCl<sub>2</sub> y DTT a concentración final de 100 μM y 1 mM respectivamente. Además, se añadieron 100 μM de MnCl<sub>2</sub> en el gel y tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). Se muestra el cambio en la expresión (*fold change*) de cada gen en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 determinado mediante Real Time RT-PCR o en su defecto mediante RNA-seq (indicado con un \*).

Como se observa en la Figura 58, los genes *hetZ*, *hepC*, *alr4973-75* (*devBCA*), *nifH2*, *rbrA*, *xisHI*, *asr1734* y *alr2165*, fueron positivos en los ensayos de EMSA confirmando que eran dianas directas de FurC. Por otro lado, dado que FurC era capaz de unirse al promotor de *nifH2* (copia de la nitrogenasa reductasa *nifH* en *Anabaena*), se analizó si la nitrogenasa canónica *nifH* era diana de FurC. Los resultados mostraron que FurC se unió a la región promotora de *nifH* comprendida desde -350 pb y +10 desde el ATG (Figura 57). Además, ensayos de Real Time RT-PCR confirmaron la regulación transcripcional de *nifH* por FurC, ya que su expresión estaba reducida en - 1,8 veces en la cepa EB2770FurC (Figura 57).

#### **4.3.3. Caracterización fenotípica de la estirpe EB2770FurC en respuesta a la ausencia de nitrato.**

Como ya se ha mencionado, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, *Anabaena* sp. PCC7120 es capaz de desarrollar heterocistos. La diferenciación de los heterocistos está precedida por una respuesta transitoria en las células vegetativas debida al estrés nutricional por déficit de nitrógeno llamada clorosis (o *bleaching*) y que implica la degradación parcial de los pigmentos fotosintéticos, incluidos los ficobilisomas. Para estudiar la respuesta de EB2770FurC a la ausencia de nitrato, las células de la estirpe EB2770FurC y *Anabaena* sp. PCC7120 se cultivaron en presencia y ausencia de nitrato y se monitorizó su evolución mediante microscopía óptica y de fluorescencia y su viabilidad.

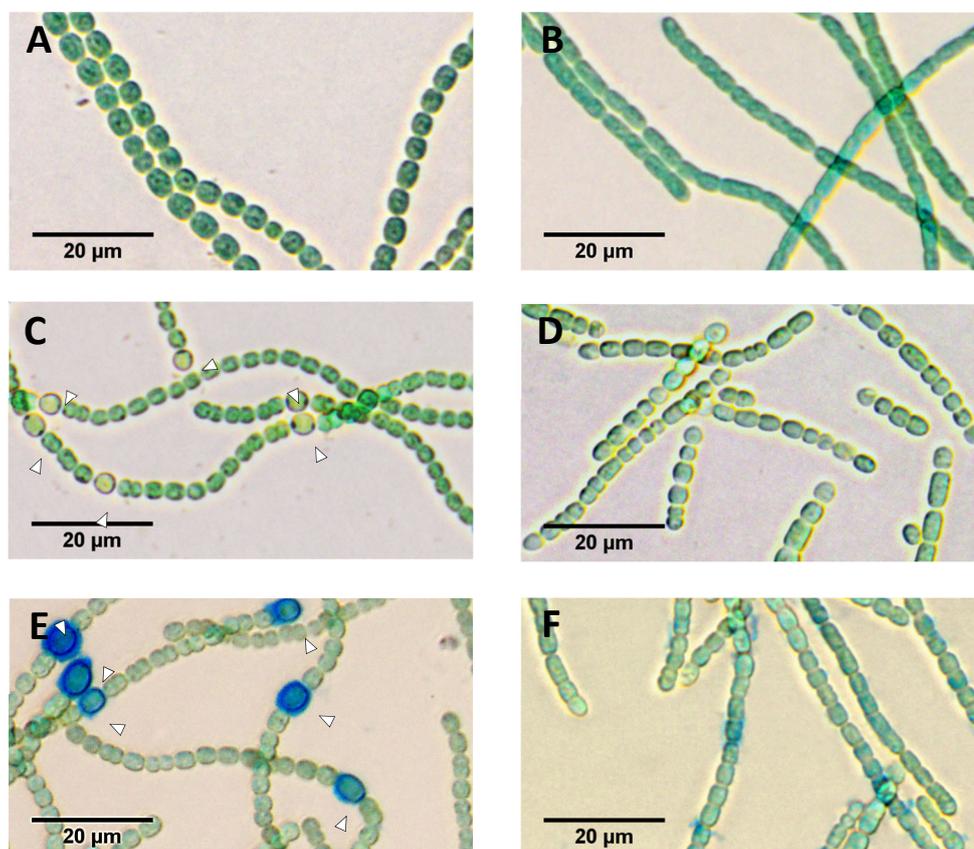
##### **4.3.3.1. La estirpe de sobreexpresión de *furC* no es capaz de formar heterocistos**

Las células de la estirpe EB2770FurC y *Anabaena* sp. PCC7120 se cultivaron en presencia y ausencia de nitrato y se monitorizó su evolución mediante microscopía óptica (Figura 59).

Como se puede ver en la Figura 59.C, D al cabo de 72 h en deficiencia de nitrógeno no se observaron heterocistos en la cepa EB2770FurC, mientras que la cepa silvestre ya presentaba un patrón normal de diferenciación (aprox. 1 heterocisto cada 10 células en el filamento). Las células de la estirpe EB2770FurC tampoco diferenciaron heterocistos a tiempos inferiores a 48 h, ni después de 96 o 120 h de deficiencia, aunque en esos momentos el crecimiento de la cepa estaba afectado sustancialmente (datos no mostrados).

La monitorización de la formación de heterocistos también se realizó mediante la tinción con azul Alcian, una tinción específica de los polisacáridos presentes en los heterocistos (Figura 59.E, F). Como se observa claramente en la figura E, los heterocistos de la cepa silvestre se tiñeron

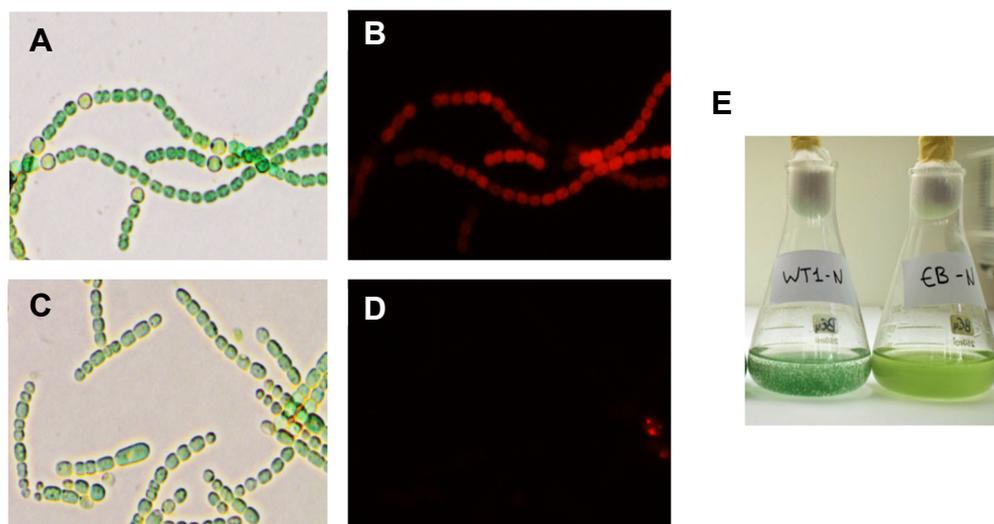
con azul Alcian, mientras que en la cepa de sobreexpresión de *furC*, no se observó ninguna célula con tal intensidad debido a la ausencia de heterocistos. No obstante, cabe comentar que por razones desconocidas se observa cierta tinción inespecífica en algunas células vegetativas, al contrario de lo que ocurre con las células vegetativas en la cepa silvestre.



**Figura 59. Microscopía óptica de campo claro de células de la estirpe silvestre *Anabaena* sp. PCC7120 y la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC en suficiencia o deficiencia de nitrato. Se muestran los filamentos de *Anabaena* sp. PCC7120 (A, C, E) y EB2770FurC (B, D, F) en condiciones estándar (A, B) o tras 72 h en deficiencia de nitrato (E, F) y teñidos con azul Alcian (E, F).**

En cuanto a la morfología, en condiciones estándar, se observaron las alteraciones morfológicas habituales en la cepa EB2770FurC con respecto a la estirpe silvestre, que ya han sido descritas en apartados anteriores (Figura 59.A, B). En deficiencia de nitrógeno, además de que la cepa EB2770FurC no era capaz de formar heterocistos, mostró filamentos más cortos y una morfología celular alterada a lo largo de todo el filamento (Figura 59.B, D).

Por otro lado, a simple vista se pudo observar que el cultivo de la cepa EB2770FurC parecía estar sufriendo un proceso de clorosis (*bleaching*) a partir del tercer día de deficiencia (Figura 60.E). Este proceso también se veía reflejado en la falta total de fluorescencia a lo largo de todo el filamento en comparación con el observado en la cepa silvestre (Figura 60.B, D).



**Figura 60. Respuesta de clorosis en la estirpe de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno.** Se muestran los filamentos de *Anabaena* sp. PCC7120 (A, B) y EB2770FurC (B, D, F) en microscopía de campo claro (A, C), fluorescencia (B, D) y el cultivo (E) tras 72 h en deficiencia de nitrato.

#### 4.3.3.2. Ensayos de viabilidad frente a la deficiencia de nitrógeno

Dada la ausencia de heterocistos en condiciones de deficiencia de nitrógeno observada en la cepa EB2770FurC, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad en dicha situación. Para ello, se realizaron tests de viabilidad de la cepa EB2770FurC en comparación con la cepa *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar en placas de BG11-agar y en deficiencia de nitrato en placas de BG11<sub>0</sub>-agar (Figura 61).

	Día					
	1	2	3	4	6	7
WT						
WT -N						
EB2770FurC						
EB2770FurC -N						

**Figura 61. Ensayos de viabilidad *Anabaena* sp PCC7120 y EB2770FurC en presencia o ausencia de nitrato.** En placas de BG11 y BG11<sub>0</sub> agar se dispusieron 5  $\mu$ L un cultivo líquido de cada cepa crecido hasta una D.O. a 750 nm de 0,4. Las placas se incubaron bajo luz continua de 30  $\mu$ mol de fotones  $m^{-2} s^{-1}$  durante 7 días. Los resultados son representativos de dos replicas biológicas por separado.

Los resultados mostraron que el crecimiento de la cepa EB2770FurC estaba completamente inhibido en deficiencia de nitrógeno lo que concordaba perfectamente con la incapacidad de la cepa EB2770FurC de formar heterocistos y por tanto de fijar

# Resultados

**Capítulo IV. Perfilando el regulón de FurC: implicación de FurC en la regulación de procesos relacionados con el balance carbono/nitrógeno.**



#### **4.4. Capítulo IV | Perfilando el regulón de FurC: implicación de FurC en la regulación de procesos relacionados con el balance carbono/nitrógeno.**

Los resultados mostrados en el capítulo anterior dejaban constancia de la versatilidad del regulador transcripcional FurC, ya que se constató que participaba en la regulación tanto de la respuesta al estrés oxidativo y la fotosíntesis (Capítulo 2) como en la regulación de la diferenciación y desarrollo del heterocisto y la fijación de nitrógeno (Capítulo 3). Con el objetivo de obtener una perspectiva global del alcance del regulón de FurC, en este apartado se realizó una aproximación *in silico* para describir la secuencia consenso de unión a DNA de FurC y encontrar nuevas cajas FurC en las regiones promotoras de todo el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. La unión de FurC a las nuevas secuencias se validó tanto *in vitro*, mediante ensayos de EMSA, como *in vivo*, determinando los niveles de expresión de las posibles dianas en la cepa de sobreexpresión de *furC* mediante Real Time RT-PCR. Posteriormente, a la vista de los resultados, que indicaban la implicación de FurC en procesos relacionados con el metabolismo del carbono y el balance carbono/nitrógeno, se estudió su interacción con diferentes metabolitos señal del balance C/N y se evaluó su efecto en la actividad del regulador.

##### **4.4.1. Definición y análisis de una secuencia consenso de unión de FurC al DNA**

###### **4.4.1.1. Obtención de la secuencia consenso de unión de FurC mediante MEME y FIMO**

Dado que hasta el momento se habían descrito un gran número de dianas directas de FurC, se utilizaron las herramientas bioinformáticas del servidor MEME-Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) para identificar las posibles secuencias diana de FurC presentes en las regiones promotoras testadas y definir una secuencia consenso (Tabla 12). Para ello, las regiones promotoras de los genes regulados directamente por FurC identificados hasta el momento, se utilizaron como “input” para el software MEME. Este software realiza un alineamiento múltiple de secuencias para encontrar motivos repetidos entre ellas.

**Tabla 12. Secuencias de unión de FurC encontradas en las regiones promotoras de genes regulados directamente por FurC.**

Gen <sup>a</sup>	<i>p</i> -valor	Secuencia de unión de FurC predicha
<i>prxA_alr4641</i>	2.40x10 <sup>-9</sup>	CATAGTCATAACGATTTTG
<i>ftsH_all4776</i>	1.05x10 <sup>-8</sup>	CGAAGTCATTACGAATTTG
<i>furC_alr0957</i>	1.25x10 <sup>-8</sup>	CAAACCTCATTACAACCTTTA
<i>srxA_asl4146</i>	1.98x10 <sup>-8</sup>	CGAAGTCATAATGACTATG
<b><i>nifH2_alr0874</i></b>	2.78x10 <sup>-8</sup>	AAAAATCATAACGATATTG
<i>ahpC_all1541</i>	3.65x10 <sup>-7</sup>	TATAATCATAATGACTACG
<b><i>hepC_alr2834</i></b>	5.23x10 <sup>-7</sup>	CTTAATCATGACAACCTTTA
<i>alr4404</i>	7.36x10 <sup>-7</sup>	TAAAGGCAAAACAACATCG
<i>CGT3_all2375</i>	7.64x10 <sup>-7</sup>	CAAAGTCATCAAAAATCTG
<b><i>xisH_alr1461</i></b>	1.05x10 <sup>-6</sup>	TGACCTCAAAACCAGATTG
<b><i>hetZ_alr0099</i></b>	1.56x10 <sup>-6</sup>	CTACATCATGACAATTCTG
<b><i>asr1734</i></b>	1.93x10 <sup>-6</sup>	TAAAGTCAACAATAGTTTG
<b><i>alr4973-75</i></b>	2.55x10 <sup>-6</sup>	AAAGATCATAACCACTGTG
<b><i>all7016</i></b>	4.22x10 <sup>-6</sup>	TAATCTCAATTCGATTTTG
<b><i>all2165</i></b>	6.55x10 <sup>-6</sup>	TAAAAGCAAAATGAGTACA
<b><i>psbAIV_all3572</i></b>	8.67x10 <sup>-6</sup>	CGTAATCATAAAAACATGA
<b><i>rbrA_alr1174</i></b>	1.16x10 <sup>-5</sup>	TAATCTGAATACCAATTTG
<b><i>alr9013</i></b>	1.58x10 <sup>-5</sup>	CAACATCATGCTGAGAATA
<i>ftsZ_alr3858</i>	4.31x10 <sup>-4</sup>	CAACCTTAACAAGATTGTA
<b><i>alr4028-33</i></b>	7.60x10 <sup>-4</sup>	TATTATCACACTGATAGTG
<b><i>nifH_all1455</i></b>	9.50x10 <sup>-4</sup>	TTAACTGTAACTAACTG
<b><i>all3914-13</i></b>	1.75x10 <sup>-3</sup>	ATAGGTCAAATTAATTTCT

<sup>a</sup> Los genes diana de FurC encontrados en esta sección se muestran en negrita.

<sup>b</sup> Secuencias putativas de unión de FurC obtenidas por FIMO (<http://meme-suite.org/tools/fimo>) escaneando la caja FurC predicha (Figura 62) en las regiones promotoras de las 22 dianas directas de FurC.

En este análisis, MEME seleccionó automáticamente 18 de las 22 regiones promotoras que se utilizaron como input para construir el logo de la caja de FurC, que consistió en un palíndromo casi perfecto de 19 pb (Figura 62). Las 18 regiones promotoras seleccionadas correspondían a los genes *prxA*, *ftsH*, *srxA*, *furC*, *nifH2*, *alr4404*, *xisH*, *ahpC*, *CGT3*, *hepC*, *hetZ*, *devBCA*, *asr1734*, *all7016*, *all2165*, *psbAIV*, *alr9013* y *rbrA*.

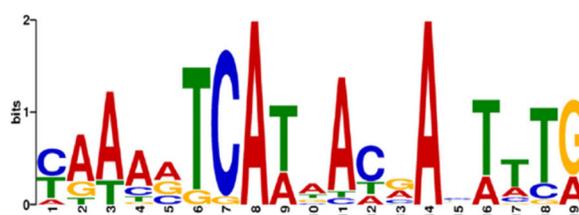
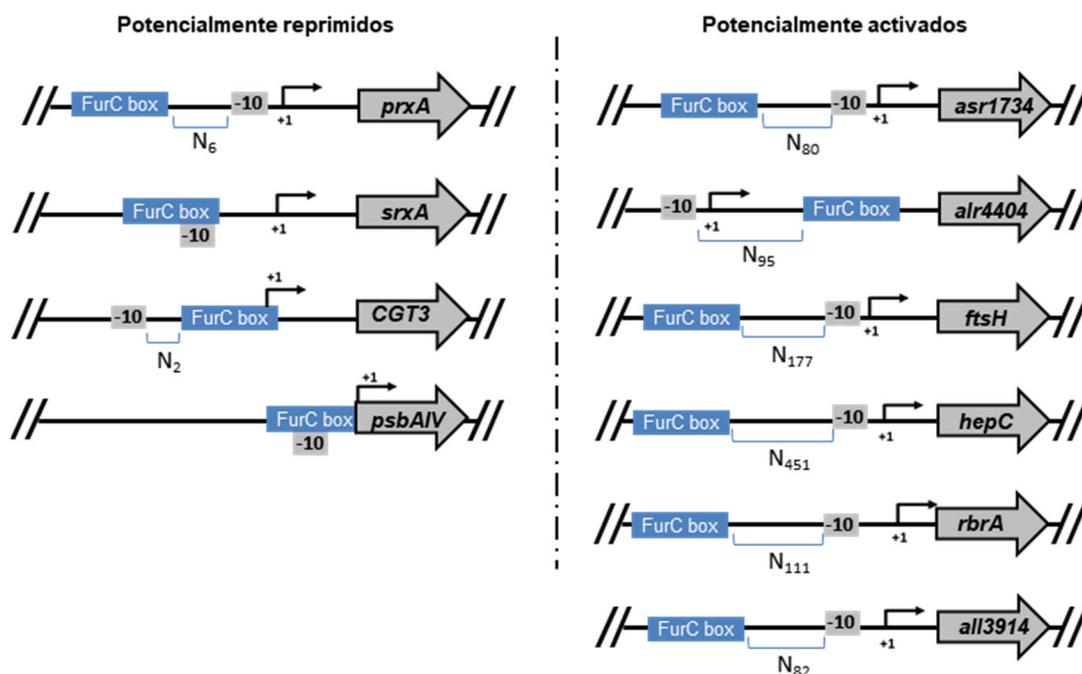


Figura 62. Logo de la caja FurC de 19 pb construida utilizando MEME.

A partir de esta caja se infirió la secuencia consenso seleccionando los nucleótidos más conservados en cada posición, dando lugar a la secuencia 5'-CAAATCATAACGACTTTG-3'. Esta secuencia indicaba que FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 presumiblemente se une a un motivo imperfecto 9-1-9 el cual comparte un 58 % de identidad con el motivo clásico de unión 9-1-9 de Fur de *E. coli* 5'-GATAATGATAATCATTATC-3' (de Lorenzo et al., 1987) y un 58 % y 42 % de identidad respectivamente con las cajas de sus parálogos FurA (5'-AAATAAATTCTCAATAAAT-3') y FurB (5'-TGATAATNATTATCA-3'). Asimismo, mostró un 42 % de identidad con la caja de PerR de *B. subtilis* (5'-TTATAATNATTATAA-3'). Adicionalmente, se utilizó el software de comparación de motivos TOMTOM para encontrar similitudes de FurC con otros motivos Fur de otras bacterias (Figura suplementaria S1). En este análisis FurC mostró mayor similitud con los motivos de las cajas Fur de *L. monocytogenes*, *Salmonella entérica* y *Yersinia pestis* (Ledala et al., 2007, Gao et al., 2008, Teixido et al., 2011). Finalmente, se utilizó la herramienta FIMO para escanear la caja FurC obtenida en las 22 regiones promotoras que se habían usado como input en MEME. Las secuencias de unión predichas para cada gen se muestran en la Tabla 12.

#### 4.4.1.2. Análisis de la posición de la caja FurC con respecto al inicio de transcripción y las cajas TATA en las secuencias promotoras seleccionadas.

Para analizar la posición relativa de las secuencias de unión de FurC al DNA, se utilizaron los promotores dianas de FurC cuyo inicio de transcripción y caja TATA se habían descrito previamente en (Mitschke et al., 2011). La comparación entre las diferentes regiones promotoras que se muestra en la Figura 63, reveló que en la mayoría de los casos en los que FurC actúa como activador, la caja FurC se encuentra lejos de la caja TATA. Sin embargo, en los genes reprimidos por FurC, los promotores presentan la caja de FurC en regiones más cercanas de la caja TATA.

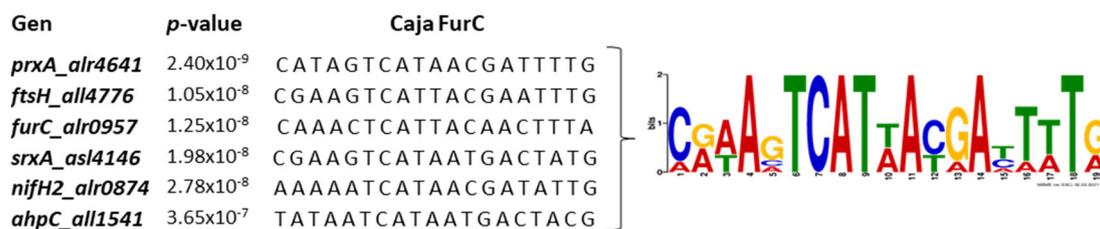


**Figura 63. Representación esquemática de la localización de la caja FurC en las regiones promotoras de los genes seleccionados.** A la izquierda se muestran los genes potencialmente reprimidos por FurC y a la derecha los genes potencialmente activados por FurC. Los inicios de transcripción se muestran con (+1) y las cajas TATA están representadas como (-10). La distancia en nucleótidos de la caja FurC a la caja TATA se indica como  $N_x$ .

Esta observación concordaría con el hecho de que los represores transcripcionales suelen actuar dificultando la unión de la RNA polimerasa a la caja TATA (Payankulam et al., 2010).

#### 4.4.2. Identificación de nuevas cajas FurC mediante cribado masivo del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

La herramienta FIMO permite realizar la búsqueda de un motivo previamente construido en un número de secuencias proporcionadas por el usuario o en secuencias depositadas en las bases de datos disponibles en el servidor. Para nuestro trabajo, las posibles regiones reguladoras o promotores del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 se extrajeron manualmente desde la base de datos RSAT, seleccionando secuencias de hasta -1000 pb *upstream* y +50 pb *downstream* y utilizando la opción “noorf” que restringe la región *upstream* solo a regiones intergénicas, cortando automáticamente las secuencias para evitar solapamientos con la región codificante del gen anterior. Estas secuencias se escanearon con una versión más restrictiva de la caja FurC que la que se mostraba en la Figura 62, construyéndola únicamente a partir de las 6 secuencias de unión más conservadas descritas en la Tabla 12, las cuales se encuentran en las regiones promotoras de los genes *prxA*, *srxA*, *ftsH*, *furC*, *ahpC* y *nifH2*. Las secuencias utilizadas para la generación de la matriz y el nuevo motivo de búsqueda resultante se muestran en la Figura 64.



**Figura 64. Secuencias de unión a FurC utilizadas por MEME para la generación de la versión restrictiva de la caja FurC y logo obtenido para la búsqueda.**

Los análisis de FIMO con el nuevo motivo de búsqueda revelaron un total de 49 secuencias de unión de FurC al DNA con un *p-value* menor que 1x10<sup>-5</sup>. La lista completa de las secuencias de unión de FurC identificadas con sus posiciones relativas al ATG y los genes asociados se muestran en la Tabla suplementaria 6. Todos los sitios de unión predichos se encontraron en regiones promotoras de genes localizados en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC7120, a excepción del sitio de unión identificado en la región promotora de *asr7140* que se encontraba localizado en el plásmido  $\alpha$  y el cual codifica una proteína hipotética. Entre las 49 potenciales dianas que arrojó la predicción, 7 de ellas habían sido previamente identificadas como dianas de FurC: *prxA*, *ftsH*, *srxA*, *ahpC*, *furC*, *nifH2* y *hepC* ((Yingping et al., 2014) y Capítulos 2 y 3), y las 42 restantes correspondían a nuevas dianas potenciales.

**4.4.2.1. Validación de las nuevas secuencias de unión de FurC mediante ensayos de retardo en gel.**

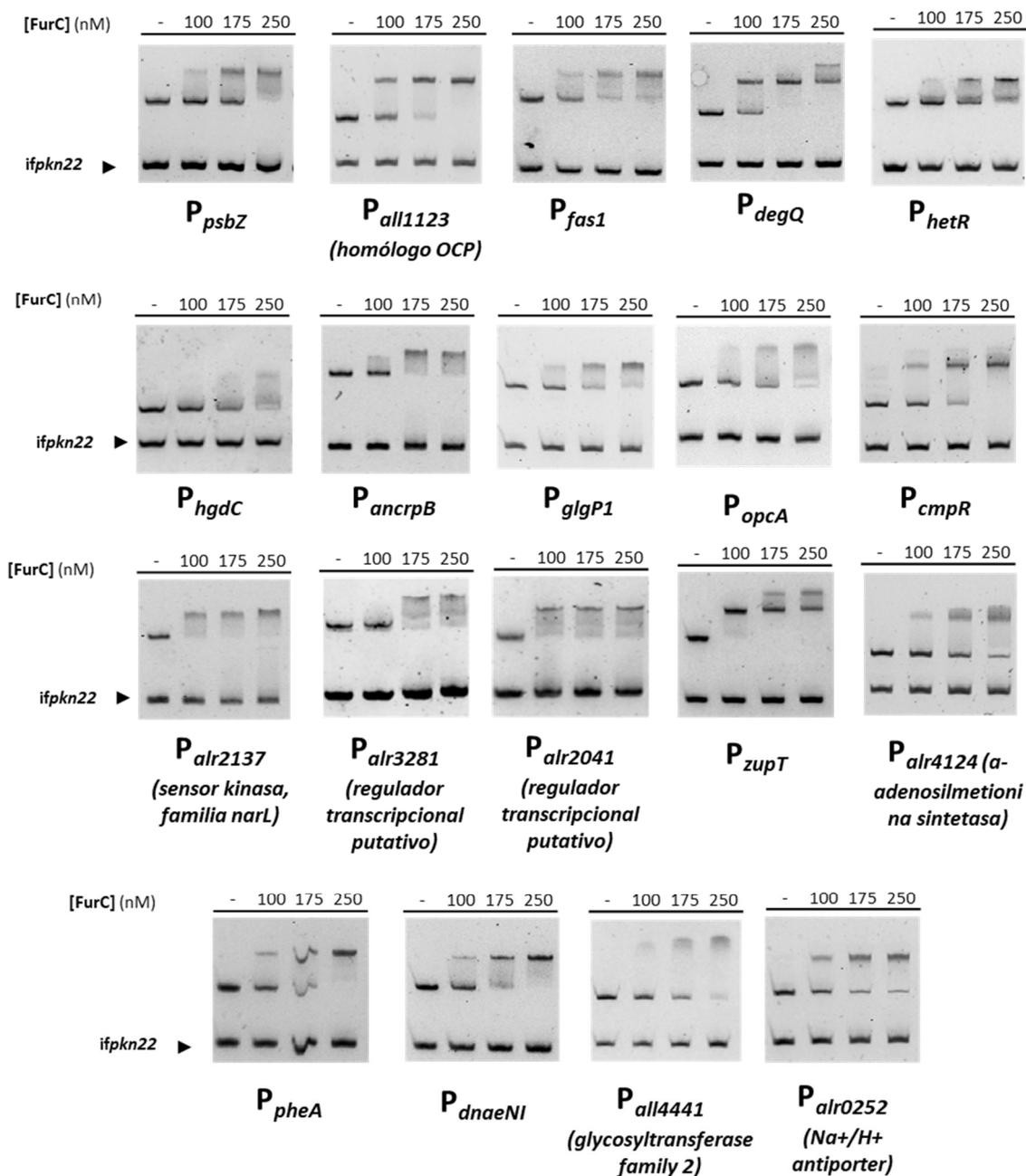
La validación de la predicción se realizó en primer lugar mediante ensayos de EMSA, con el objetivo de discernir la capacidad de FurC para unirse *in vitro* a las secuencias promotoras que contenían los motivos identificados. Se utilizaron cada una de las regiones promotoras de las potenciales dianas de FurC identificadas en la predicción, excluyendo por un lado los promotores de los genes que ya habían sido descritos previamente como dianas de este regulador ((Yingping et al., 2014) y Capítulos 2 y 3) y por otro lado los de los genes que codifican proteínas hipotéticas. Los ensayos de EMSA mostraron que de las 25 potenciales dianas de FurC analizadas, 18 eran dianas directas de este regulador (Figura 65 y Tabla 13).

**Tabla 13. Nuevas dianas directas de FurC encontradas por la búsqueda de la caja de FurC en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 y resultado de su validación por EMSA.**

ORF	Gen <sup>a</sup>	EMSA <sup>b</sup>
Fotosíntesis y fotoprotección		
<b><i>all0067</i></b>	<i>cob(I)</i> alamin adenosiltransferasa	-
<b><i>all1123</i></b>	parálogo de la NTD de la <i>Orange Carotenoid Protein</i> (OCP)	+
<b><i>all3797</i></b>	<b><i>fas1</i></b>	+
<b><i>alr4548</i></b>	<b><i>psbD</i></b> ; proteína D2, PSII	-
<b><i>alr5164</i></b>	<b><i>degQ</i></b>	+
<b><i>asr3992</i></b>	<b><i>psbZ</i></b>	+
Metabolismo del nitrógeno y diferenciación del heterocisto		
<b><i>all5346</i></b>	<b><i>hgdC</i></b> ; transportador ABC específico del heterocisto	+
<b><i>alr2325</i></b>	<b><i>ancrpB</i></b> ; regulador transcripcional recepto de AMPc	+
<b><i>alr2822</i></b>	proteína isla <i>hep</i>	-
<b><i>alr2339</i></b>	<b><i>hetR</i></b>	+
Metabolismo central del carbono		
<b><i>all0862</i></b>	<b><i>cmpR</i></b> ; regulador transcripcional tipo LysR de respuesta a bajos niveles de CO <sub>2</sub>	+
<b><i>all0945</i></b>	<b><i>sdhB</i></b> ; subunidad de la proteína hierro-azufre succinato deshidrogenasa	-
<b><i>all1272</i></b>	<b><i>glgp1</i></b> ; glucógeno fosforilasa	+
<b><i>all4018</i></b>	<b><i>opcA</i></b> ; proteína de ensamblaje de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	+
<b><i>alr3809</i></b>	<b><i>carB</i></b> ; carbamoil fosfato sintasa	-
Funciones reguladoras		
<b><i>alr2137</i></b>	sistema de dos componentes, familia NarL, sensor quinasa	+
<b><i>alr3281</i></b>	regulador transcripcional putativo	+
Homeostasis del zinc		
<b><i>all0473</i></b>	<b><i>zupT</i></b>	+
Metabolismo de aminoácidos		
<b><i>alr4124</i></b>	S-adenosilmetionina sintetasa	+
<b><i>alr4334</i></b>	<b><i>pheA</i></b> ; pefenato deshidratasa	+
Otros		
<b><i>all0879</i></b>	proteína de unión a zinc de la familia alcohol deshidrogenasa	-
<b><i>all2368</i></b>	factor de iniciación de la traducción IF-3	-
<b><i>all3578</i></b>	<b><i>dnaeNI</i></b> ; subunidad de la DNA polimerasa III	+
<b><i>all4441</i></b>	glicosiltransferasa de la familia 2	+
<b><i>alr0252</i></b>	antiportador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	+

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>b</sup> El resultado de la validación por ensayos de EMSA se indica como +/-



**Figura 65. Ensayos de retardo en gel para la validación de la unión de FurC a los promotores de los genes seleccionados.** Fragmentos de DNA libres o mezclados con concentraciones crecientes de FurC (nM) separados en gel PAGE 6 %. En todos los ensayos se emplearon  $MnCl_2$  y DTT a concentración final de 100  $\mu M$  y 1 mM respectivamente. Se añadieron 100  $\mu M$  de  $MnCl_2$  en el gel y tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*).

En cuanto a la función de las nuevas dianas reguladas por FurC se encontró que estas formaban parte de un amplio rango de procesos celulares, incluyendo la fotosíntesis, el metabolismo nitrogenado y la diferenciación del heterocisto, metabolismo central de carbono, homeostasis del

zinc, metabolismo de aminoácidos, así como varias funciones reguladoras, entre otras categorías funcionales (Tabla 13). Algunas de las nuevas dianas identificadas están en consonancia con trabajos anteriores (Capítulos 2 y 3) donde se mostraba la implicación de FurC en la modulación de la fotosíntesis y el metabolismo nitrogenado.

En concreto en el caso de la regulación de procesos relacionados con la fotosíntesis se encontró que genes como *psbZ* (*asr3992*), que codifica una subunidad estructural del PSII, *fas1* (*all3797*), un ortólogo de *fas1* de *Anabaena* L31 que parece estar involucrado en la respuesta de la cianobacteria al estrés por radiación UV-B (Babele et al., 2015) y *all1123*, uno de los parálogos del dominio N-terminal de la *Orange Carotenoid Protein* (OCP) presente en *Anabaena* sp. PCC7120 (Lopez-Igual et al., 2016) eran dianas directas de FurC (Figura 65, Tabla 13). La proteína OCP interacciona con las antenas de los fotosistemas, modulando la cantidad de energía de excitación que llega a los centros de reacción (Niyogi & Truong, 2013). Sin embargo, no se ha demostrado que All1123 desempeñe esta función en la fotoprotección de *Anabaena* sp. PCC7120, sino que se ha propuesto que podría actuar como proteína transportadora de carotenoides (Lopez-Igual et al., 2016). Además, en otra publicación se ha propuesto que puede estar implicada en la respuesta al estrés por luz UV-B (Shrivastava et al., 2015). Asimismo, FurC se unió al promotor de *alr5164* (Figura 65, Tabla 13), el cual se había descrito previamente como un posible homólogo en *Anabaena* sp. PCC7120 de la proteína DegQ (Hahn et al., 2015), que en *Synechocystis* sp. PCC6803 actúa como una proteasa implicada en la degradación de la subunidad PsbO del PSII (Roberts et al., 2012) y su expresión aumenta en condiciones de exceso de luz (Jansen et al., 2005).

Respecto a los sitios de unión identificados en regiones promotoras de genes relacionados con el metabolismo de nitrógeno y la diferenciación de heterocisto, cabe destacar que FurC fue capaz de unirse *in vitro* a la caja identificada en el promotor de HetR. HetR es un regulador transcripcional clave para la diferenciación del heterocisto (Buikema & Haselkorn, 1991), siendo esencial para la expresión de múltiples genes involucrados en la diferenciación, desarrollo y maduración del heterocisto, incluyendo genes como *patS*, *hepA*, *hetP* y él mismo (Higa & Callahan, 2010) (Videau et al., 2016) (Feldmann et al., 2011) (Huang et al., 2004). Dada la relevancia de este resultado, se realizaron experimentos adicionales para estudiar en más detalle la posible modulación de *hetR* ejercida por FurC, cuyos resultados se comentarán más adelante (apartado 4.4.3).

Además de al promotor de *hetR*, FurC se unió al promotor del gen que codifica al transportador ABC específico de heterocistos HgdC (Figura 65, Tabla 13). HgdC forma parte de un transportador de tipo ABC llamado HgdCB, localizado en la membrana celular del heterocisto y encargado de la

correcta formación de la capa de glicolípidos presente en la envuelta de estas células (Shvarev et al., 2018).

Por otro lado, los ensayos de EMSA confirmaron que el gen *ancrpB* (*alr2325*) era diana directa de FurC. El genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 codifica 2 proteínas receptoras de AMPc, llamadas AnCrpA y AnCrpB (Suzuki et al., 2007). AnCrpA regula la expresión de un conjunto de genes relevantes en los procesos de la fijación de nitrógeno como *nifB*, *hglE* o *coxBII* (Suzuki et al., 2007). AnCrpB se induce en respuesta a rehidratación y regula tanto a genes relacionados con este proceso, como a genes de respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Por lo tanto, se ha propuesto que AnCrpB modularía proteínas que intervienen en la adaptación a ambas situaciones, y que serían comunes a las estrategias de la cianobacteria para sobrellevar tanto el estrés que supone la rehidratación como el generado por la deficiencia de nitrógeno (Higo et al., 2007).

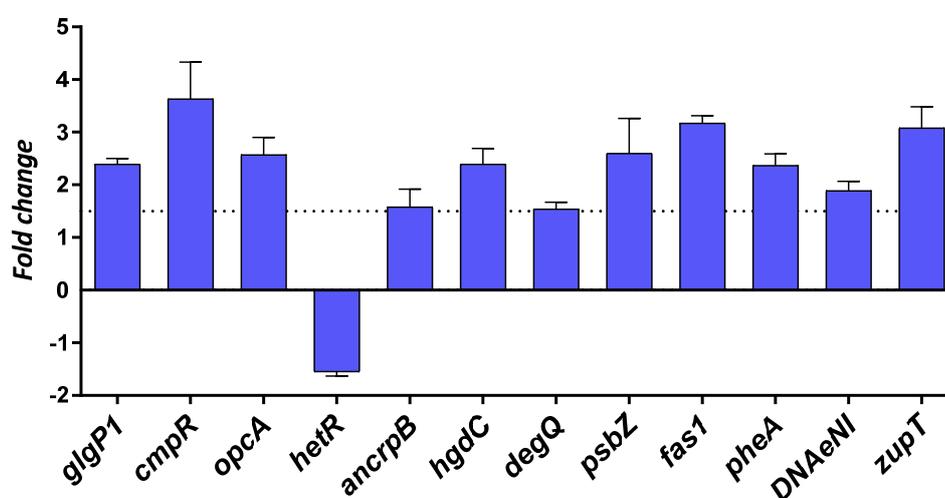
Adicionalmente, de manera remarcable, se encontró que diversos genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y la fijación de carbono también eran dianas directas de FurC (Figura 65, Tabla 13). Entre ellos se encuentran, *glgP1* (*all1272*), gen que codifica la enzima glucógeno fosforilasa involucrada en el proceso de degradación del glucógeno, *opcA*, que codifica la proteína que activa a la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en el heterocisto, abasteciendo a su vez de poder reductor a la nitrogenasa, y *cmpR* (*all0862*), que codifica un regulador transcripcional de tipo LysR que activa a los sistemas de transporte de bicarbonato Cmp en respuesta a la limitación de carbono inorgánico (Ci) (Lopez-Igual et al., 2012) y cuya función, como se comentará más adelante, es crucial para el control del balance C/N.

Otros sitios de unión de FurC identificados y validados *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel se encontraron en las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras, como las de los reguladores transcripcionales putativos (*alr3281* y *alr2041*) y la sensor quinasa putativa (*alr2137*) (Figura 65, Tabla 13). Curiosamente, otra de las dianas directas identificadas en la predicción y validada *in vitro*, fue el transportador de zinc ZupT (*all0473*) (Figura 65, Tabla 13). Este gen es el ortólogo de *zupT* de *Escherichia coli*, que codifica un transportador de baja afinidad por zinc, responsable de la incorporación de zinc en condiciones de suficiencia de este metal (Nies, 2012, Grass et al., 2002). Por último, se definieron nuevas dianas de FurC involucradas en el metabolismo de aminoácidos como los genes *alr4124* y *pheA*, o relacionados con otras funciones como *dnaeNI* (*all3578*) que codifica una subunidad de la DNA polimerasa III, *alr0252*, que codifica un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y *all4441*, que codifica una glicosiltransferasa de la familia 2 (Figura 65, Tabla 13).

#### 4.4.2.2. Análisis de la expresión génica de las nuevas dianas de FurC en la estirpe EB2770FurC

Con el objetivo de estudiar si FurC estaba regulando *in vivo* la expresión de las nuevas dianas descritas en este trabajo, se realizaron ensayos de Real Time RT-PCR para el estudio de la expresión relativa de los genes seleccionados en la cepa de sobreexpresión de *furC*, EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120. Para este estudio, se seleccionaron 12 genes los cuales estaban anotados con un nombre específico (*glgP1*, *cmpR*, *opcA*, *hetR*, *hgdC*, *ancrpB*, *degQ*, *psbZ*, *fas1*, *pheA*, *DNAeNI* y *zupT*).

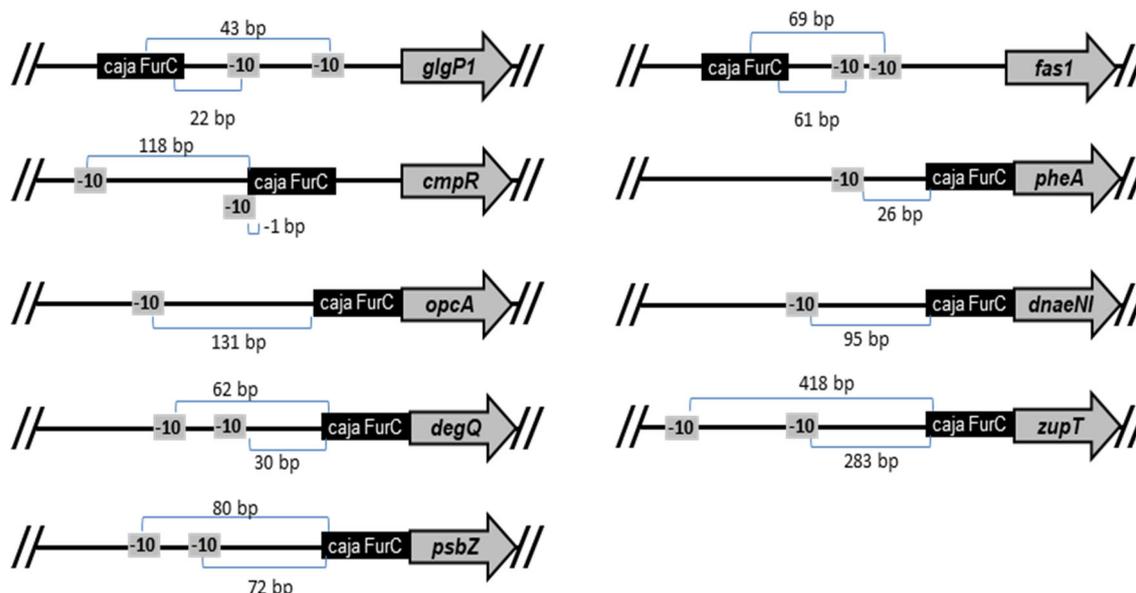
Como se muestra en la Figura 66, todos los genes testados presentaron su expresión alterada en la estirpe EB2770FurC, lo que validaría *in vivo* los resultados observados por los ensayos de retardo en gel y confirmaría la regulación transcripcional de estos genes por FurC. Cabe señalar que en la cepa de sobreexpresión de *furC* se incrementó la transcripción de la mayoría de las nuevas dianas, lo que indicaría que en esos casos FurC podría estar actuando como activador transcripcional. Una excepción fue *hetR*, cuya expresión disminuyó en la estirpe EB2770FurC (Figura 66).



**Figura 66.** Cambio relativo en la expresión de las nuevas dianas directas de FurC en la cepa EB2770FurC respecto a la cepa silvestre *Anabaena* sp. PCC7120. Transcripción relativa de los genes *glgP1*, *cmpR*, *opcA*, *hetR*, *ancrpB*, *hgdC*, *degQ*, *psbZ*, *fas1*, *pheA*, *dnaeNI* y *zupT* determinada por Real Time RT-PCR. Los valores de cambio en la expresión se expresan como Fold change y corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y tres replicas técnicas.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que FurC actúa como activador en gran parte de sus dianas, como ya se había sugerido en el apartado anterior en los casos de otras dianas directas como *ftsH*, *hepC* o *psbAIV* descritas en capítulos previos de esta tesis.

Así mismo, se evaluó la posición relativa en los promotores de la caja FurC con respecto a la caja TATA (Figura 67). El análisis reveló que, en la mayoría de los casos, la caja FurC se localizaba lejos de la caja o cajas TATA descritas previamente (Mitschke et al., 2011).



**Figura 67. Representación esquemática de la posición relativa de la caja FurC respecto a la caja TATA en los promotores de las nuevas dianas de FurC.** Se muestra la distancia en pares de bases (bp) a la caja/s TATA (-10).

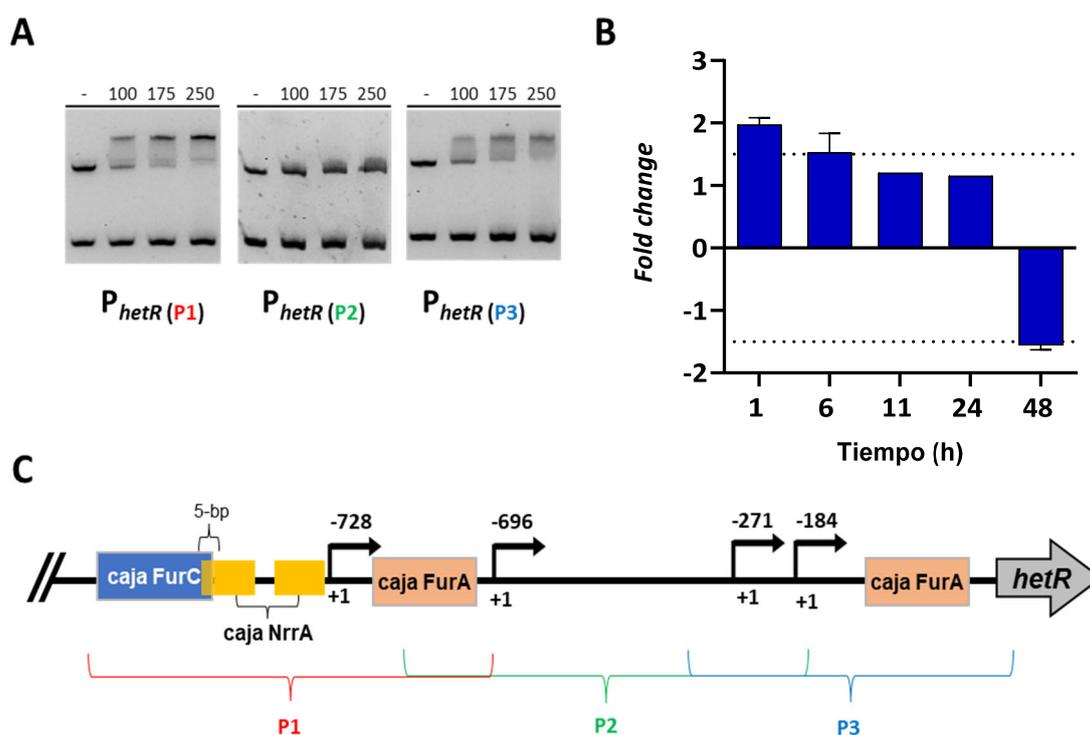
Teniendo en cuenta que estos genes vieron aumentada su expresión en la cepa de sobreexpresión de *furC* (Figura 66), los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de la posible relación entre la función activadora o represora de FurC con la posición relativa de la caja FurC respecto a la caja TATA.

#### 4.4.3. Regulación de la expresión de *hetR* por FurC.

Dada la relevancia de HetR en el metabolismo nitrogenado de *Anabaena* sp. se planteó estudiar en mayor profundidad como modulaba FurC la expresión de este regulador. A pesar de su importancia, el conocimiento sobre la regulación de la expresión de *hetR* es escaso. A nivel transcripcional, se había descrito que NtcA regulaba indirectamente la expresión de HetR a través del regulador transcripcional NrrA (Ehira & Ohmori, 2006b). Así mismo se había observado que FurA de *Anabaena* sp. PCC7120 era capaz de unirse *in vitro* al promotor de HetR (Gonzalez et al., 2013). Además, en la bibliografía se habían descrito mecanismos de regulación postraduccional de HetR. Por un lado la interacción proteína-proteína de HetR con las proteínas PatS, PatX, HetN (Khudyakov et al., 2020) (Feldmann et al., 2011), las cuales actúan como reguladores negativos de la actividad

de HetR y por otro lado la regulación del estado oligomérico de HetR a través de la fosforilación (Valladares et al., 2016, Roumezi et al., 2019).

En la Figura 68.C se muestra el promotor de *hetR* con la posición relativa de la caja FurC identificada por FIMO. Como se puede observar, la caja FurC se encontraba en la región distal del promotor HetR (P1), curiosamente solapando 5 pb con la caja de NrrA previamente identificada (Ehira & Ohmori, 2006a).



**Figura 68. Estudio de la regulación de *hetR* por FurC.** A) Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones distal (P1), media (P2) y proximal (P3) del promotor de *hetR*. En todos los ensayos se utilizó 100  $\mu$ M de  $MnCl_2$  y 1 mM DTT en el tampón de unión y 100  $\mu$ M de  $MnCl_2$  en el gel y tampón de electroforesis. Se utilizó como DNA competidor un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). B) Estudio de la expresión de *hetR* en la estirpe de sobreexpresión de *furC* respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 a diferentes tiempos desde el inicio de experimento. Los resultados se representan como *fold change* y corresponden a la media de tres replicas biológicas y tres replicas técnicas. C) Representación esquemática del promotor de *hetR* mostrando los indicios de transcripción (+1) y los sitios de unión de NrrA, FurA y FurC.

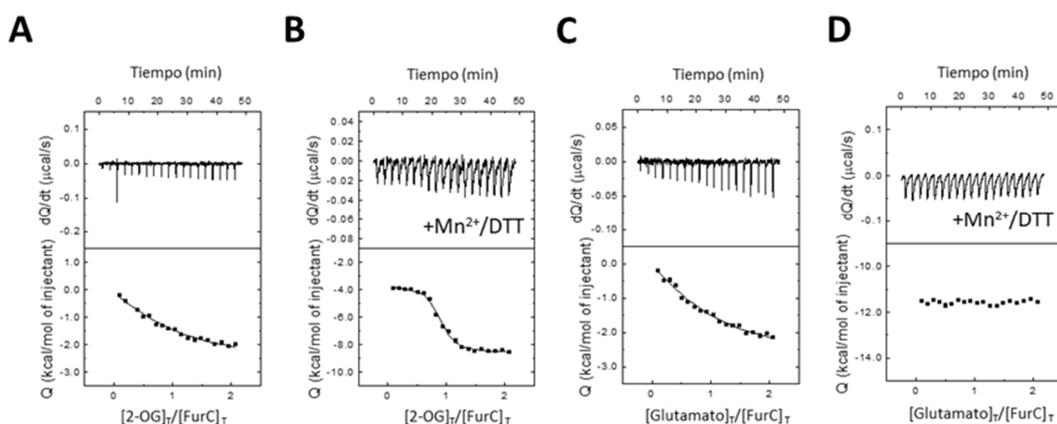
Para analizar la totalidad del promotor se estudió también la unión de FurC con las regiones media (P2) y proximal (P3) del promotor de HetR (Figura 68.A). Los resultados indicaron que FurC también era capaz de unirse a la región proximal del promotor de HetR (P3). Como datos adicionales en el esquema del promotor de HetR se muestran también los cuatro inicios de transcripción (tsps) descritos para *hetR* y los dos sitios de unión que se encontraron para el parálogo FurA (Figura 68.C).

De forma complementaria, se estudió mediante Real Time RT-PCR la expresión relativa de *hetR* en EB2770FurC respecto a la cepa silvestre a lo largo del tiempo (1, 6, 11, 24 y 48 h). Como se puede observar en la Figura 68.B la expresión de *hetR* cambiaba con el tiempo en la cepa EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120, induciéndose hasta 2 veces tras 1 h desde el comienzo del experimento y disminuyendo su expresión hasta aproximadamente - 1,5 veces tras 48 h, lo que sugiere que FurC puede estar regulando *in vivo* la transcripción de *hetR*. Una posible explicación para esta variación en el cambio de la expresión de *hetR* en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 a lo largo del experimento podría ser debido a posibles variaciones a lo largo del tiempo de factores como el estado redox o la disponibilidad de metal, los cuales se ha visto que modulan la actividad de FurC (Yingping et al., 2014) (apartado 4.1.2.8)).

#### **4.4.4. FurC une 2-OG aumentando la afinidad por sus promotores diana.**

Algunos reguladores transcripcionales como NtcA, NdhR o FurA son capaces de interactuar con 2-OG con un efecto en su capacidad de unión por sus promotores (Guio et al., 2020, Jiang et al., 2018, Vazquez-Bermudez et al., 2002, Zhao et al., 2010). Como se comentaba en introducción, el 2-OG es un metabolito central que conecta el ciclo de Krebs y el ciclo GS/GOGAT acumulándose en condiciones de deficiencia de nitrógeno y actuando como señal del balance C/N de la célula (Huerco & Dixon, 2015, Muro-Pastor et al., 2001).

En vista de la implicación de FurC en el metabolismo del nitrógeno y el carbono descrita en este trabajo, se propuso analizar si FurC podría detectar cambios en el ratio C/N interactuando con 2-OG. Para ello, se realizaron ensayos de calorimetría entre FurC y 2-OG en diferentes condiciones. Como se muestra en la Figura 69, FurC fue capaz de interactuar con 2-OG en presencia de  $Mn^{2+}$  y DTT con una constante de disociación de 1,2  $\mu M$  (Figura 69.A, B). Para determinar si esta interacción era específica, se realizaron controles utilizando glutamato como ligando.



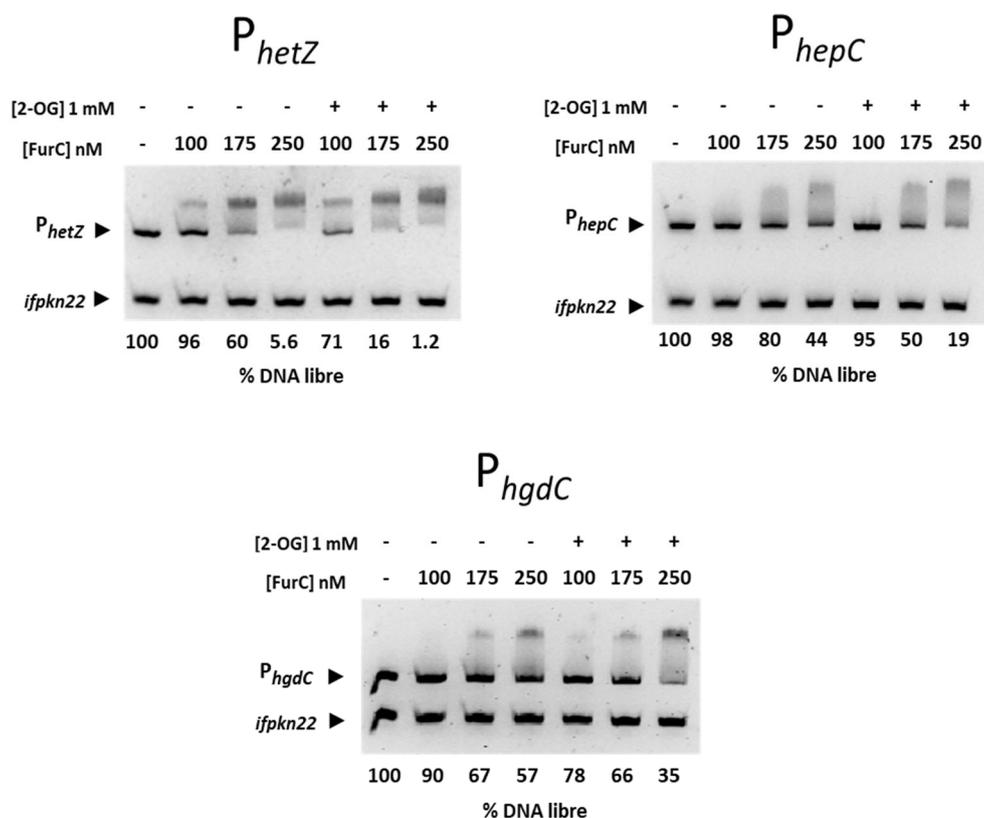
**Figura 69. Análisis mediante ITC de la interacción de FurC con 2-OG y glutamato bajo diferentes condiciones experimentales.** A) Titulación de FurC con 2-OG. B) Titulación de FurC con 2-OG en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnCl}_2$  y 1 mM de DTT. C) Titulación de FurC con glutamato. D) Titulación de FurC con glutamato en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnCl}_2$  y 1 mM de DTT. Se muestran las representaciones de  $dQ/dt$  vs tiempo y  $Q$  vs ratio molar ligando/proteína de los datos obtenidos en la calorimetría. Los ensayos se realizaron a 25  $^\circ\text{C}$  en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM.

Además, como se observa en la Figura 69, en ausencia de  $\text{Mn}^{2+}$  y DTT, FurC mostró afinidades similares por el 2-OG y el glutamato. Sin embargo, la presencia  $\text{Mn}^{2+}$  y DTT provocó un incremento de 40 veces en la afinidad por el 2-OG, mientras que no se observó interacción con el glutamato (Figura 69.C, D), lo que indicaba que la unión entre el 2-OG y FurC era específica.

Además, se llevaron a cabo experimentos de ITC similares utilizando la molécula de 2-fosfoglicolato (2-PG) como potencial ligando. Como se comentaba en la Introducción, este metabolito actúa también como molécula señal que refleja los niveles de carbono en la célula (Zhang et al., 2018a). Los reguladores transcripcionales involucrados en el control del metabolismo central del carbono CmpR y NdhR, son capaces de unir 2-PG modulando la regulación de sus dianas (Zhang et al., 2018a, Jiang et al., 2018, Nishimura et al., 2008). Sin embargo, los experimentos de calorimetría de FurC con 2-PG revelaron que no existía interacción.

En vista de la capacidad de unir 2-OG de FurC, se realizaron ensayos de EMSA en presencia de 2-OG de FurC con los promotores de tres dianas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno (*hetZ*, *hepC* y *hgdC*) (Figura 70). Los resultados mostraron que la presencia de 1 mM de 2-OG aumentaba la actividad de unión de FurC por estos promotores, como se puede deducir por el porcentaje de DNA libre, no unido a proteína. Estos datos permiten concluir que el aumento de la

concentración de 2-OG en la célula por ejemplo en una situación de respuesta a deficiencia de nitrógeno aumentaría la unión de FurC a sus promotores.



**Figura 70. Evaluación de la actividad de unión de FurC a los promotores de *hetZ*, *hepC* y *hgdC* en presencia o ausencia de 1 mM de 2-OG.** En todos los ensayos se utilizó 100  $\mu$ M de  $MnCl_2$  y 1 mM DTT en el tampón de unión y 100  $\mu$ M de  $MnCl_2$  en el gel y tampón de electroforesis. Como DNA competidor inespecífico se utilizó un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). Se incluye el porcentaje de DNA libre calculado mediante análisis de densitometría con el programa Quantity One Analysis (Bio-Rad).

# Resultados

Capítulo V. Consecuencias de la sobreexpresión de *furC* en la composición del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120.



#### **4.5. Capítulo V | Consecuencias de la sobreexpresión de *furC* en la composición del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120.**

El estudio del medio extracelular de las cianobacterias, fundamentalmente del exoproteoma y exometaboloma, ha despertado interés en los últimos años debido al papel que juegan en la organización de la matriz extracelular y la formación de biofilms (Desvaux et al., 2009)(Douglas, 2020). La composición del exoproteoma ya se ha estudiado en cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC6803 (Gao et al., 2014), *Synechococcus* sp. PCC7942 (Christie-Oleza et al., 2015) (Yegorov et al., 2021), *Anabaena* sp. PCC7120 (Oliveira et al., 2015, Hahn et al., 2015), *Nostoc flageliforme* (Wang et al., 2020) y *Nostoc punctiforme* (Vilhauer et al., 2014), comparando el perfil de sus exoproteomas en diferentes condiciones de crecimiento. En general estos estudios sugieren que las cianobacterias pueden modular activamente la composición del exoproteoma de manera similar al proteoma intracelular, regulando la secreción de proteínas en respuesta a estímulos ambientales (Giner-Lamia et al., 2016). Teniendo en cuenta la participación de FurC en la regulación de diferentes genes de respuesta a estreses abióticos y su capacidad de respuesta a diferentes señales en *Anabaena* sp. PCC7120 (Capítulos 1, 2, 3 y 4), se planteó estudiar el potencial impacto de la sobreexpresión de *furC* en la composición del exoproteoma y exometaboloma de esta cianobacteria.

En este apartado se describirá el protocolo optimizado para la obtención del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y de la estirpe EB2770FurC y se analizará la composición diferencial del exoproteoma de ambas cepas mediante SWATH, una técnica de proteómica de alto rendimiento que, a diferencia de otras técnicas, permite realizar una cuantificación relativa de las proteínas presentes en las diferentes muestras. Por último, se analizará el perfil del exometaboloma de la EB2770FurC en comparación con el de *Anabaena* sp. PCC7120. Este trabajo se desarrolló en colaboración con el Prof. Dr. Ignacio Luque (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC. Sevilla) y con el Prof. Dr Richard Helm (Department of Biochemistry, Virginia Tech. Blacksburg, USA)

##### **4.5.1. Optimización del método de obtención y aislamiento del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC.**

Para la obtención y aislamiento del exoproteoma y exometaboloma, inicialmente se puso a punto un procedimiento basado en el aplicado por Oliveira et al, (Oliveira et al., 2015), en el que se realizaba un paso de concentración de la fracción del exoproteoma en membranas

concentradoras de Amicon 3 kDa (Millipore), separando de esta forma las fracciones de exoproteoma y exometaboloma. Sin embargo, al llevar a cabo este protocolo en nuestro laboratorio, durante el paso de concentración del exoproteoma, se pudo observar la formación de una consistencia mucosa en varias de las muestras. Esta consistencia dificultó la homogeneización y correcta cuantificación de las muestras, así como su posterior análisis mediante espectrometría de masas. Incluso tras el proceso de precipitación y digestión proteica realizado en los servicios de proteómica, la muestra presentó una consistencia demasiado espesa que aumentaba la presión del sistema de cromatografía del equipo de espectrometría de masas. Finalmente, aunque se llegaron a obtener datos parciales de la composición del exoproteoma tanto por identificación de bandas por SDS-PAGE como analizando algunas de las muestras en líquido, los datos obtenidos no eran comparables entre las diferentes aproximaciones por lo que se procedió a poner a punto otro protocolo para el aislamiento.

El procedimiento utilizado finalmente para el aislamiento del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC se detalla en el apartado 3.12.2. Este nuevo protocolo permitió el análisis de las muestras de exoproteoma mediante SWATH-MS. Este protocolo se basó en el procedimiento descrito por Vilhauer et al (Vilhauer et al., 2014) en el que no se realiza el paso de concentración de la muestra de exoproteoma, que permitió evitar así los problemas de consistencia de la muestra mencionados anteriormente. Sin embargo, con las muestras de exoproteoma, surgió un problema adicional con las sales del medio de cultivo, ya que precipitaban tras la resuspensión del liofilizado e interferían en el análisis por SWATH-MS. Este problema se solucionó tanto realizando un paso de la muestra por columnas *desalting* como realizando un paso de diálisis. Sin embargo, se seleccionó el paso de diálisis ya que el número de proteínas identificadas era el doble que en la misma muestra tratada con columnas *desalting*.

Respecto a las muestras aisladas para la determinación del exometaboloma, estas se enviaron al Prof. Dr. Richard Helm para su procesado y análisis. Las muestras enviadas no mostraron ningún problema de solubilidad. Además, en los análisis de LC-MS los niveles de surfactantes o contaminantes fueron prácticamente indetectables, lo que puso en valor las precauciones tomadas para la obtención y aislamiento de la muestra indicadas en el apartado 3.12.1. A continuación, se muestra un esquema resumen del procedimiento de aislamiento del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB277FurC (Figura 71).

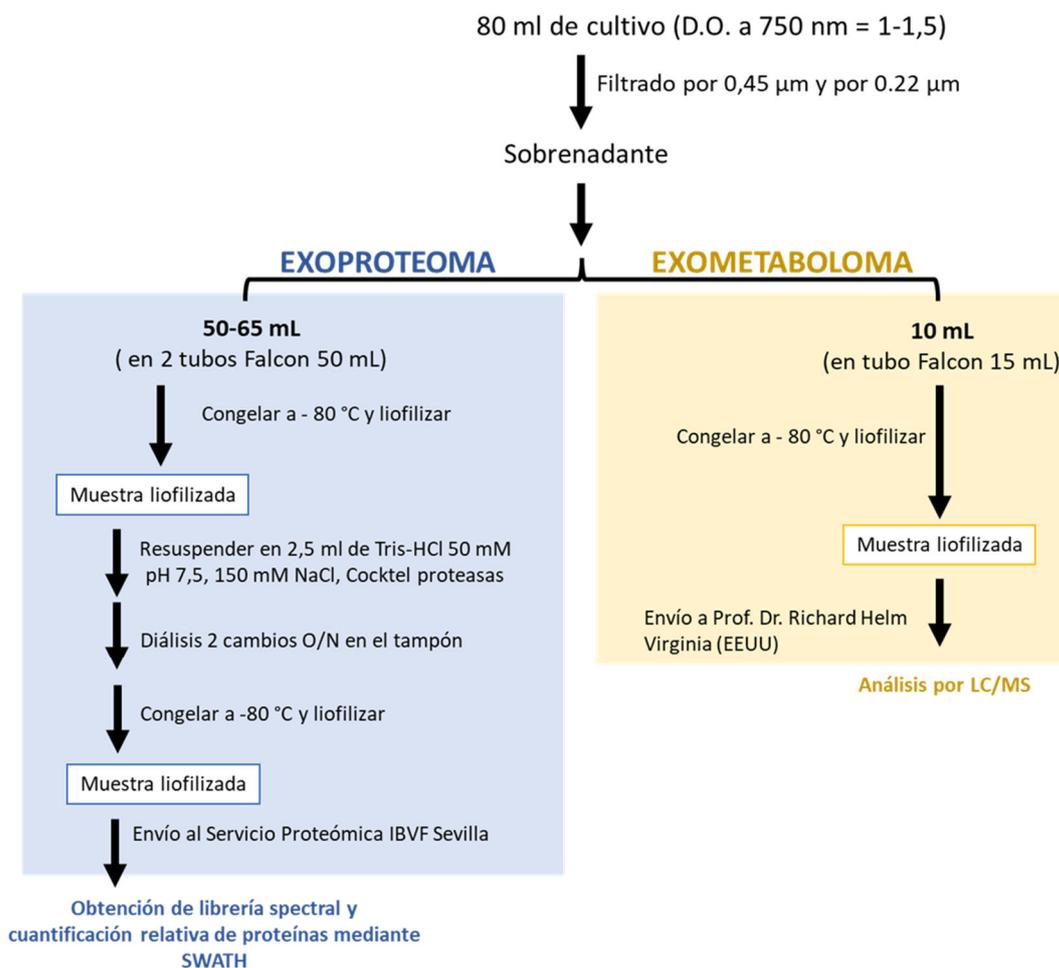


Figura 71. Esquema resumen del procedimiento utilizado para la obtención de las fracciones de exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y EB2770FurC.

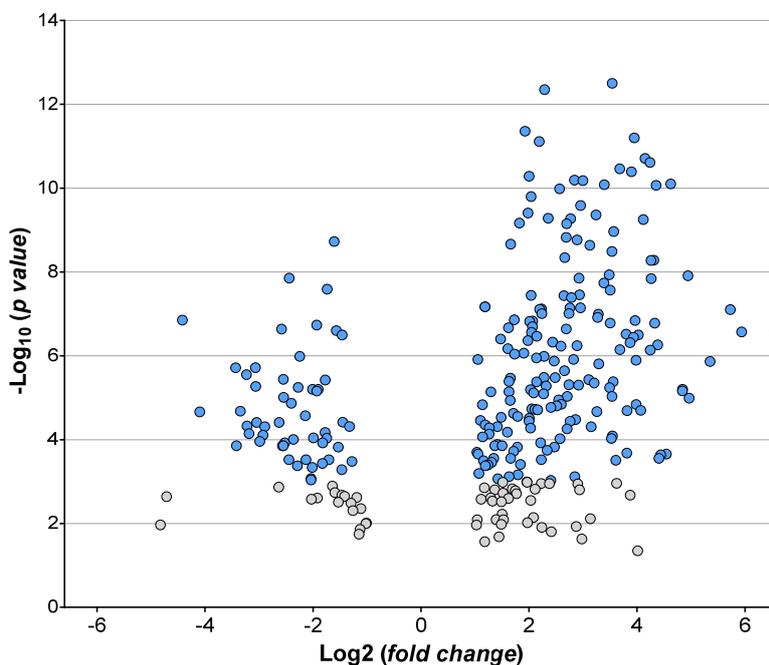
#### 4.5.2. La sobreexpresión de *furC* altera el perfil del exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

Una cuestión a tener en cuenta a la hora de analizar en detalle la composición del exoproteoma es conocer cómo una determinada proteína llega al medio extracelular. Dentro del grupo de proteínas presentes en la fracción considerada como exoproteoma, algunas pueden llegar al espacio extracelular, a través del transporte activo, y acumularse ahí jugando un papel específico (Armengaud et al., 2012). Otras proteínas con función estructural en otras partes de la célula también pueden trasladarse a través de la membrana externa, como algunos componentes de la propia pared celular o proteínas que participan en su biogénesis y se liberan al medio extracelular como resultado de la renovación de la pared celular (Becker et al., 2014, Johnson et al., 2013). Además, las proteínas periplásmicas y de la membrana externa también

pueden encontrarse en el exoproteoma como resultado, por ejemplo, de la fuga pasiva de proteínas durante la división celular y la citocinesis, o por ruptura de la integridad del filamento, o incluso por la eliminación activa de proteínas/enzimas no funcionales (Desvaux et al., 2009). En última instancia, las proteínas citoplasmáticas también pueden ser un componente importante del exoproteoma, como se ha concluido en diversos estudios del exoproteoma de diferentes cianobacterias (Oliveira et al., 2015, Vilhauer et al., 2014). Estas proteínas pueden proceder de la lisis celular causada por la propia muerte celular o la manipulación mecánica durante la obtención de muestra, aunque se ha descrito que algunas proteínas citoplasmáticas podrían ser secretadas activamente al medio extracelular mediante mecanismos de secreción no clásicos que aún están por caracterizar (Wang et al., 2016, Bendtsen et al., 2005, Ebner et al., 2016). En este trabajo a pesar de todas las precauciones tomadas para minimizar la lisis celular, no podemos excluir que algunas de las proteínas identificadas sean proteínas citoplasmáticas. No obstante, en este estudio se ha realizado una comparativa relativa entre el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* y el de *Anabaena* sp. PCC7120, por lo que solo se tienen en cuenta únicamente aquellas las proteínas cuya abundancia cambia entre las cepas. Así, en el análisis que se realiza a continuación se considerarán todas las proteínas identificadas, aunque el origen y la función extracelular, si la hay, de la mayoría requiera de estudios adicionales.

Los análisis de proteómica diferencial SWATH mostraron diferencias en la abundancia de 285 proteínas entre la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) y *Anabaena* sp. PCC7120, con un *p-value* por debajo de 0,05 y un *fold change* superior a 2 (o menor de 0,5), equivalente a un valor de  $\text{Log}_2 \text{fold change}$  de  $\pm 1$ . En la Figura 72, se presentan los datos en un gráfico tipo volcano (Volcano plot), enfrentando el valor de  $\text{Log}_2 (\text{fold change})$ , frente al  $-\text{Log}_{10} (p\text{-value})$ . Las gráficas tipo Volcano son de las más empleadas en las ciencias -ómicas, ya que permiten la rápida identificación de los resultados más significativos entre grandes cantidades de datos (Cui & Churchill, 2003). De esta forma, la representación de los datos con este gráfico permitió realizar un nuevo punto de corte, considerando únicamente las proteínas que presentaban un  $\text{Log}_2 (\text{fold change}) \pm 1$  pero con un  $-\text{Log}_{10} (p\text{-value}) \geq 3$ , correspondiente con valores  $p\text{-value} \leq 0,0001$ . Las proteínas dentro de este rango (213) se representan en azul en la Figura 72 y se resumen en la Tabla suplementaria S7. En la Figura 72, se puede apreciar que el número de proteínas sobrerrepresentadas en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 (160 proteínas) es considerablemente mayor que el número de

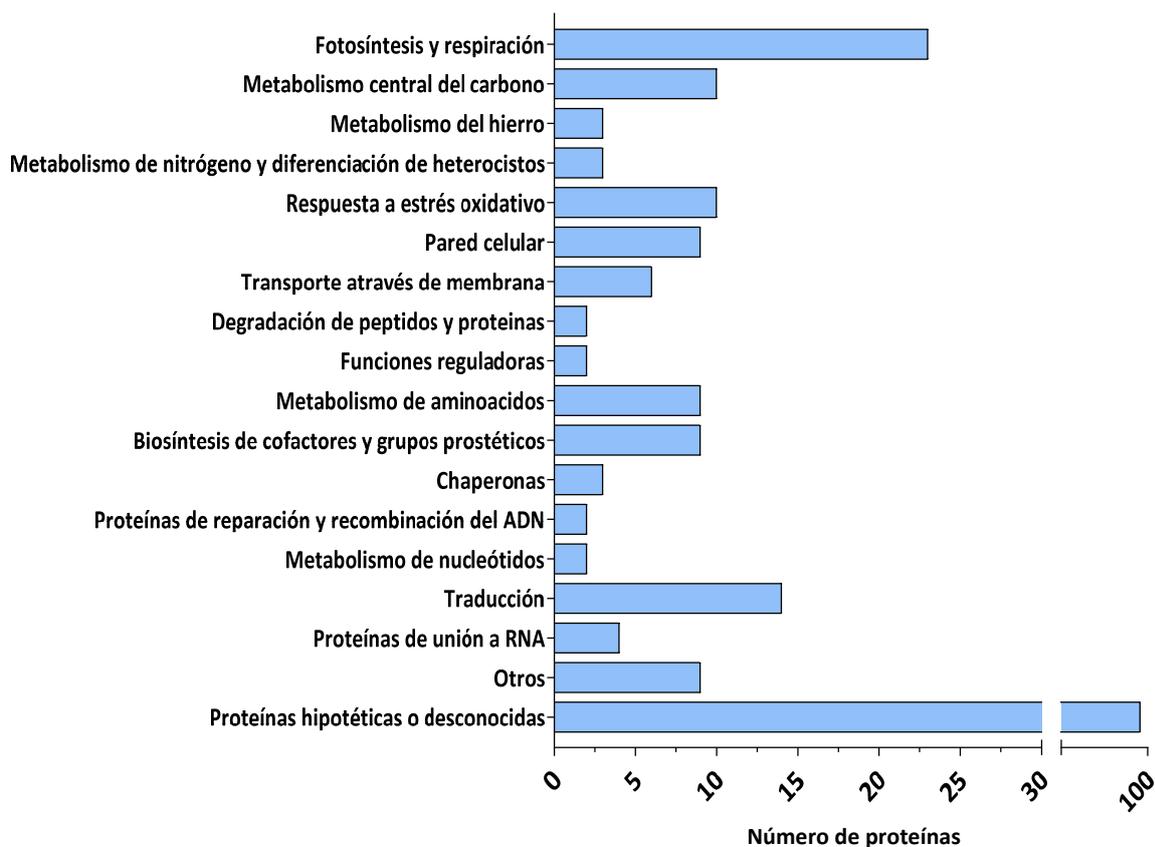
proteínas cuya abundancia es menor en la cepa de sobreexpresión de *furC* que en la estirpe silvestre (53 proteínas).



**Figura 72. Volcano plot del exoproteoma diferencial de la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC y *Anabaena* sp. PCC7120.** Se enfrentan los valores de  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  frente a  $-\log_{10}(p\text{-value})$  de cada proteína. Se representan en azul las proteínas con un  $\text{Log}_2(\text{fold change}) \pm 1$  pero con un  $-\log_{10}(p\text{-value}) \geq 3$ , y en gris las proteínas fuera de ese rango.

De las 213 proteínas representadas en azul en el Volcano plot, el 23 % (50) habían sido identificadas previamente en la fracción de exoproteoma y/o secretoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (Oliveira et al., 2015, Hahn et al., 2015) y las otras 163 correspondían a proteínas identificadas por primera vez en esta fracción. La localización subcelular de las proteínas con abundancia diferencial entre ambas estirpes se analizó con la herramienta *psort* (Tabla suplementaria S7). Del total de proteínas, aproximadamente un tercio (78) poseían péptido señal, sugiriendo su secreción activa por *Anabaena* sp. PCC7120 (Tabla suplementaria S7)

El análisis de la función de las proteínas que se acumularon de forma diferencial en el exoproteoma de EB2770 respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120 mostró que 120 correspondían a proteínas anotadas funcionalmente o con dominios relevantes e indicativos de su función, y aproximadamente la mitad (93) eran proteínas con función hipotética o desconocida (Figura 74 y Tabla suplementaria S7).



**Figura 73. Categorías funcionales de las proteínas cuya abundancia varía en el exoproteoma de la estirpe EB2770FurC con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120.** Las categorías funcionales se describieron de acuerdo con la anotación disponible en las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>), KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) y la información disponible en la bibliografía.

Además de las proteínas hipotéticas y las incluidas dentro de la categoría “otros”, las categorías funcionales principales más afectadas del exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* incluyen, en orden, fotosíntesis y respiración (23 proteínas), la traducción (14 proteínas), el metabolismo central del carbono (10 proteínas), la respuesta a estrés oxidativo (10 proteínas), la pared celular (9 proteínas), metabolismo de aminoácidos (9 proteínas) y biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos (9 proteínas). La sobrerrepresentación de categorías como la fotosíntesis y respiración, el metabolismo central del carbono y la respuesta a estrés oxidativo en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*, estaría en concordancia con las funciones descritas para FurC en los anteriores capítulos de esta tesis doctoral. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la abundancia de estas proteínas en el exoproteoma no solo depende de su transcripción dentro de la célula, sino que también intervienen procesos postranscripcionales, así como su secreción y acumulación en el

medio celular. Estos procesos podrían verse influidos a su vez por factores alterados en la estirpe de sobreexpresión de *furC* y cambiar el perfil del exoproteoma de EB2770FurC.

En la Tabla 14 se resumen las proteínas cuya abundancia cambia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto al de *Anabaena* sp PCC7120 y que habían sido descritas como dianas de FurC y/o mostraron diferencias en la expresión según los análisis de RNA-seq de ambas estirpes cultivadas en condiciones estándar y/o deficiencia de nitrógeno.

**Tabla 14. Lista de proteínas cuya abundancia cambia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120 descritas previamente como dianas de FurC y/o mostraron diferencias en la expresión en cultivos en condiciones estándar y/o deficiencia de nitrógeno del Capítulo 4.**

ORF	Proteína/Descripción <sup>a</sup>	Log2 ( <i>fold change</i> )	Predicción localización <sup>b</sup>	Péptido señal <sup>c</sup>	Regulada por FurC <sup>d</sup>	RNA-seq <sup>e</sup>
<b>Fotosíntesis y respiración</b>						
<i>PSII</i>						
All3854	PsbO; proteína potenciadora del complejo generador de oxígeno del PSII.	3,50	U*	Y		(b)
<i>Ficobilisoma</i>						
Alr0021	ApcA; subunidad alfa de aloficocianina	3,28	U		+	(b)
Alr0523	PecB; subunidad beta de ficoeritrina	3,54	U			(b)
Alr0022	ApcB; subunidad beta de aloficocianina	3,95	U		+	(b)
Alr0528	CpcB; subunidad beta de C-ficocianina	3,57	U		+	(b)
Alr0524	PecA; cadena alfa de la ficoeritrocianina	1,32	U			(b)
Alr0530	CpcC; linker ficobilisoma 32.1 kDa	2,86	CM		+	(b)
<b>Metabolismo central del carbono</b>						
All4131	Pgk; fosfoglicerato quinasa	-2,63	C#			(b)
<b>Metabolismo de hierro</b>						
All4026	lacT	2,59	OM			(a)
<b>Respuesta a estrés oxidativo</b>						
All3797	Fas1; stress UV	1,62	U*		+	
All2375	CGT3; peroxiredoxina	2,32	U		+	
Alr0672	similar a cloroperoxidasa de vanadio	2,94	U			(b)
Alr4641	PrxA; peroxirredoxina	4,97	C#		+	(a)
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>						
Alr2051	hidrolasa de glutatión	-2,44	U*	Y		(b)
<b>Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos</b>						
All2347	MenB; 1,4-dihidroxy-2-naphthoyl-CoA sintasa	1,62	C			(a)
Alr1241	UbiX; Flavin prenyltransferasa	2,51	C			(a)
<b>Traducción</b>						
Alr5303	RplL; 50S proteína ribosomal L7/L12	3,87	U*			(b)
<b>Otros</b>						
All1750	similar a proteína con repetición WD	1,42	U			(b)
<b>Proteínas hipotéticas o desconocidas</b>						
All1193	proteína hipotética	6,55	U	Y		(a,b)
Alr1460	proteína hipotética	2,84	C			(b)
Alr7345	proteína hipotética	-4,42	CM	Y		(a,b)
All4050	proteína hipotética	2,00	C			(b)

Alr0359	proteína desconocida	2,76	U	Y	(+)
All7503	proteína desconocida	4,03	U		(b)
All7013	proteína desconocida	-2,01	U		(a,b)
Alr1819	proteína hipotética	-2,14	CM	Y	(a)
Asr1134	proteína hipotética	4,38	U		<b>(a,b)</b>
Alr2947	proteína desconocida	1,37	U	Y	<b>(b)</b>
Alr2117	proteína desconocida	-2,98	OM	Y	(b)
All1783	proteína hipotética	-2,52	U		(b)
Alr4783	proteína hipotética	1,96	CM		<b>(b)</b>

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>) e información disponible en la bibliografía.

<sup>b</sup> Localización celular predicha por PSORTb (<https://www.psorb.org/psorb>). CM (Membrana celular), U (Desconocida), C (Citoplasma), P (Periplasma), OM (Membrana externa), S-I (Capa S de la membrana externa), E (Extracelular). El asterisco indica la posibilidad de que la proteína puede encontrarse en varias localizaciones simultáneamente. El símbolo # indica las proteínas encontradas en la mayoría de exosomas según KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>c</sup> Se indican con el símbolo “+” las proteínas directamente reguladas por FurC y con “(+)” las dianas potenciales de FurC por presentar caja de FurC en sus promotores

<sup>d</sup> La predicción de presencia de péptido señal se realizó con PrediSi (<http://www.predisi.de/home.html>). Las proteínas con péptido señal se muestran con una “Y”

<sup>e</sup> Se indican las proteínas cuya expresión estaba alterada en el análisis de RNA-seq de la estirpe de sobreexpresión de *furC* respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar (a) o en condiciones de deficiencia de nitrógeno (b). En negrita las que mostraron misma tendencia en su abundancia en el exoproteoma y en expresión génica.

Dentro del conjunto de proteínas con diferente abundancia en los exoproteomas de ambas estirpes, 7 de ellas habían sido identificadas como dianas de FurC incluyendo las proteínas estructurales del ficobilisoma (*ApcA*, *ApcB*, *CpcB* y *CpcC*), la proteína de respuesta a estrés por UV *Fas1* y las peroxirredoxinas *CGT3* y *PrxA*. Además, la proteína hipotética *Alr0359* es una potencial diana de este regulador ya que presenta un sitio de unión a FurC identificado durante la búsqueda de cajas FurC en el genoma del Capítulo 4 de esta tesis (Tabla 14).

Por otra parte, se observó que al analizar los datos de transcriptómica diferencial de ambas estirpes (sobreexpresión de *furC* y *Anabaena* sp. PCC7120) en condiciones estándar de cultivo y/o en deficiencia de nitrógeno (Capítulo 3) (Tablas suplementarias S2, S3, S4 y S5), únicamente se habían detectado cambios en la expresión de 28 de las proteínas que aparecían con diferente abundancia al comparar ambos exoproteomas (Tabla 14). Además, entre estas 28 únicamente 9 proteínas mostraron la misma tendencia de incremento o disminución en su abundancia y expresión génica. Este era el caso de la enzima fosfoglicerato quinasa (*Pgk*) del ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB), cuyos niveles se reducen 2,6 veces en el exoproteoma de EB2770FurC y su expresión también está reprimida en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Recientemente se ha descrito que *pgk* es regulado a nivel postranscripcional por el RNA pequeño de respuesta a estrés por nitrógeno *NsRi4* (Brenes-Álvarez et al., 2021). Además, en condiciones de deficiencia de nitrógeno los niveles de *Alr0762*, una proteína similar a una cloroperoxidasa de vanadio, aumentaron tanto en el transcriptoma

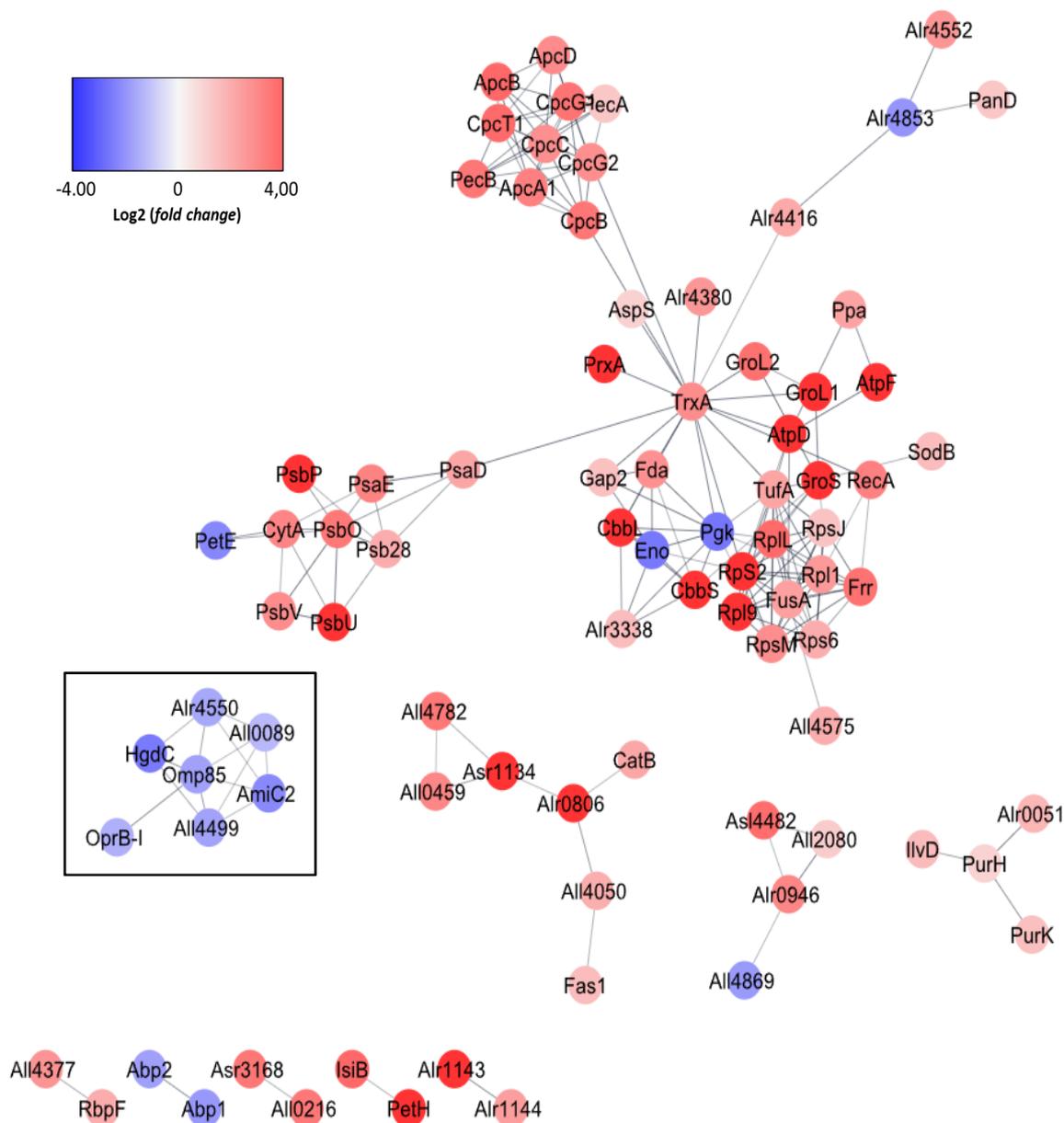
como en el exoproteoma de EB2770FurC con respecto a *Anabaena* sp. Por otra parte, en el exoproteoma de EB2770FurC aumentaron los niveles de lacT con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 y también aumentó su expresión génica en EB2770FurC en condiciones estándar. lacT es un transportador de la membrana externa dependiente de TonB (TBDT, *TonB-dependent transporters*) involucrado en el transporte de hierro y cobre (Nicolaisen et al., 2010a). Por último, varias proteínas hipotéticas o desconocidas mostraron incremento en su abundancia en el exoproteoma y en su expresión génica en EB2770FurC en comparación con *Anabaena* sp. PCC7120. La expresión de All1193 y Asr1134 fue mayor en la estirpe EB2770FurC que en *Anabaena* sp. PCC7120 tanto en condiciones estándar como en deficiencia de nitrógeno, mientras que la expresión de Alr1460, All4050, Alr2947, Alr4783 en EB2770FurC solo fue mayor que en la estirpe silvestre en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Entre ellas únicamente All4050 había sido identificada previamente en el secretoma y exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (Hahn et al., 2015, Oliveira et al., 2015).

Cabe mencionar que otras dianas de FurC cuya abundancia es diferente en ambos exoproteomas, como PrxA, CGT3, ApcA o CpcB, presentaron niveles de expresión más bajos en la estirpe de sobreexpresión de *furC* en condiciones estándar (Capítulo 2 y 3). Sin embargo, en el caso del exoproteoma de EB2770FurC estas proteínas parecen estar en mayor abundancia que en el de *Anabaena* sp. PCC7120. Este hecho indicaría que, a pesar de la regulación transcripcional de FurC sobre los promotores de los genes que codifican esas proteínas, la exportación de estas al medio extracelular puede estar a su vez alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC* y su acumulación en el medio extracelular es independiente de la regulación directa de FurC. No es así en el caso de Fas1, para la cual FurC actúa como activador y aparece en mayor abundancia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*.

#### **4.5.2.1. Análisis de las posibles redes de interacción entre las proteínas cuya abundancia está alterada en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*.**

Una aproximación paralela para analizar los datos obtenidos fue utilizar la herramienta STRING, capaz de generar una red de interacción de proteínas con la información que contiene en su extensa base de datos acerca de las posibles interacciones físicas o funcionales entre un grupo de proteínas (Szklarczyk et al., 2021). Para la construcción de la red se utilizó la información disponible en la base de datos relacionada con la co-ocurrencia, co-expresión, contexto genómico y evidencias experimentales con un corte de 0,7 en el nivel de fiabilidad de

las anotaciones empleadas. A partir de estos datos, STRING identificó 115 proteínas altamente relacionadas entre ellas y las integró en la red que se muestra en la Figura 74.



**Figura 74. Red construida con STRING (<https://string-db.org/>).** En azul se representan las proteínas con mayor abundancia relativa y en rojo las proteínas con menor abundancia relativa en el exoproteoma de EB2770FurC con respecto al exoproteoma de *Anabaena* sp PCC7120. Los datos se visualizaron y procesaron con StringApp en Cytoscape.

En esta red de interacción cabe destacar la posición de la proteína TrxA1, que conecta hasta 17 proteínas diferentes y está ubicada en el centro de la red. Ésta enlaza grupos de proteínas relacionados con la fotosíntesis, la respiración, el metabolismo del carbono y la traducción. Este resultado es coherente dada la evidencia experimental de dichas interacciones en su ortólogo TrxA en *Synechocystis* sp. PCC6803 (Mata-Cabana et al., 2007, Lindahl & Kieselbach, 2009), que junto con el hecho de que se exporten juntas al medio, podría interpretarse como una funcionalidad de TrxA en el medio extracelular. Estos resultados son de gran interés para el conocimiento general del exoproteoma de la cianobacteria como se comentará en la discusión de esta Tesis.

Entre las demás proteínas de la red, llamó particularmente la atención el clúster aislado que se encuentra señalado en la figura con un recuadro (Figura 74). Este clúster está constituido por proteínas cuya abundancia en la estirpe de sobreexpresión de *furC* era menor que en la estirpe silvestre en todos los casos, al contrario que la mayoría de las proteínas presentes en la red. Este grupo de proteínas incluía 3 porinas de tipo OprB (Alr0834, Alr4550 y All4499), HgdD, un transportador de tipo TolC de la membrana externa, AmiC2, una amidasa de mureína involucrada en la formación de nanoporos en la capa del peptidoglicano entre células del filamento (Bornikoel et al., 2017), y Omp85, una porina de inserción de proteínas en la membrana externa. Estas proteínas están clasificadas, junto con otras proteínas que no aparecen conectadas en la red construida con STRING, dentro de la categoría “pared celular”. Entre ellas se encuentra AmiC1, amidasa de mureína cuyo gen *amiC1* es el primero del operón junto con *amiC2*, y LptA, una proteína del sistema de exportación de lipopolisacáridos a la membrana externa (Tabla suplementaria S7). Cabe destacar que además de las proteínas incluidas en el clúster señalado, el resto de proteínas correspondientes a la categoría “pared celular” también estaban en menor abundancia en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto al exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120. A modo de resumen, en la Tabla 15 se muestran las proteínas relacionadas con la pared celular con diferente abundancia relativa en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto al exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120.

**Tabla 15. Lista de proteínas relacionadas con la pared celular con diferencias en la abundancia relativa en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto al exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120.**

ID	Proteína/Descripción <sup>a</sup>	Log2 ( <i>fold change</i> )	Identificada previamente <sup>b</sup>	Predicción localización	Péptido señal
<b>Alr0834</b>	OprB-I; porina tipo OprB	-1,46	(1)	OM-S-I	
<b>Alr0093</b>	AmiC2; N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	-2,25		OM	Y
<b>Alr2269</b>	Omp85; proteína del ensamblaje y mantenimiento de la membrana externa	-1,75		OM	Y
Alr0092	AmiC1; N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	-1,82		U*	Y
Alr4067	LptA; Proteína de exportación de lipopolisacáridos a la membrana externa	-2,57		U	Y
<b>Alr2887</b>	HgdD; transportador tipo TolC membrana externa	-2,55	(1)	OM	
<b>Alr4550</b>	porina tipo OmpA	-1,61	(1,2)	OM-S-I	Y
<b>Alr4499</b>	porina tipo OprB	-1,74	(1)	OM-S-I	Y

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

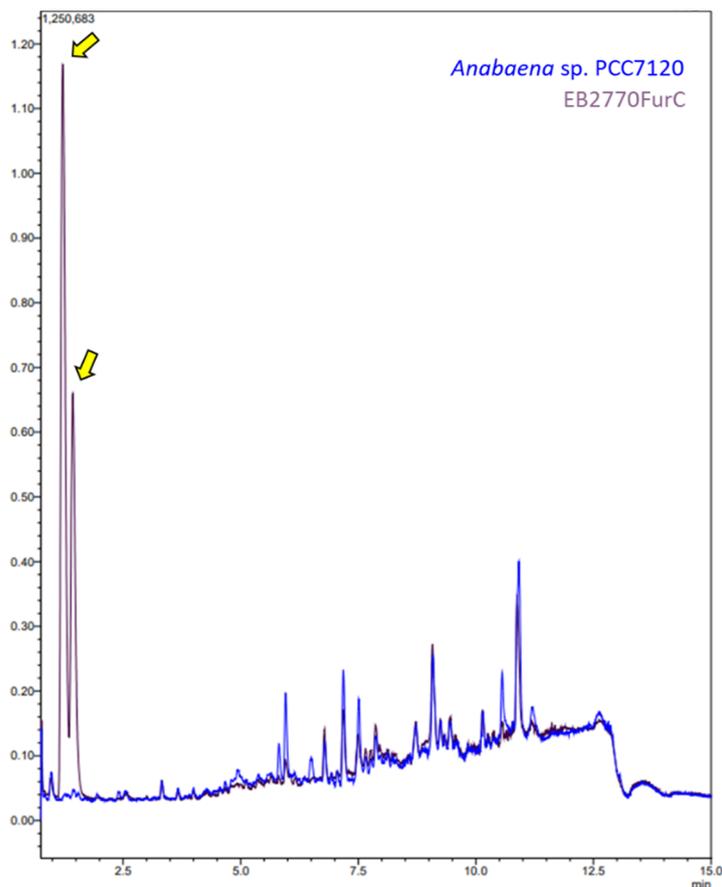
<sup>b</sup> Proteínas previamente identificadas en el exoproteoma (1): (Oliveira et al. 2015) y/o secretoma (2): (Hahn et al. 2015) de *Anabaena* sp. PCC7120 o cepas derivadas.

<sup>c</sup> Localización celular predicha por PSORTb (<https://www.psort.org/psortb>). CM (Membrana celular), U (Desconocida), C (Citoplasma), P (Periplasma), OM (Membrana externa), S-I (Capa S de la membrana externa), E (Extracelular). El asterisco indica la posibilidad de que la proteína puede encontrarse en varias localizaciones simultáneamente. El símbolo # indica las proteínas encontradas en la mayoría de exosomas según KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>d</sup> Se indican las proteínas cuya expresión estaba alterada en el análisis de RNA-seq de la estirpe de sobreexpresión de *FurC* con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar (a) o en condiciones de deficiencia de nitrógeno (b).

#### 4.5.2.2. Estudio comparativo de los perfiles exometabólicos de las cepas de sobreexpresión de *FurC* y *Anabaena* sp. PCC7120.

Las muestras procedentes del aislamiento del exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *FurC* y de *Anabaena* sp. PCC7120 fueron analizadas por LC-MS en el laboratorio de Dr. Richard Helm (Virginia Tech, Blacksburg, USA.). Hasta la fecha únicamente se dispone del perfil del exometaboloma general y no de la cuantificación relativa de cada metabolito de la muestra. Como se observa en la Figura 75, la comparativa de los perfiles del exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 (WT) y la estirpe de sobreexpresión *furC* permitió detectar grandes cantidades de dos iones que eluían con tiempos de retención cortos en la fracción del exometaboloma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (Figura 75).



**Figura 75. Comparativa de los perfiles metabolómicos de las fracciones del exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC71200 y la cepa de sobreexpresión de *furC*.**

Estos iones correspondían a los metabolitos anhydroMurNAc y GlcNAc-anhydroMurNAc. La capa de peptidoglicano o mureína de *Anabaena* sp. PCC710 es un copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y el Ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4. Como se comentará en profundidad en la discusión, la presencia de estos dos metabolitos en el exometaboloma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* podría relacionarse con la disminución de las proteínas AmiC1 y AmiC2 en el exoproteoma, dado que son enzimas que actúan directamente sobre la capa de peptidoglicano, o a su vez con la desregulación de las otras proteínas relacionadas con la pared celular, cuya disminución en el exoproteoma podría desestabilizarla, resultando en la acumulación de anhydroMurNAc y GlcNAc-anhydroMurNAc en el medio extracelular (Tabla 15, Figura 75).

En conjunto estos resultados indican que la sobreexpresión de *furC* influye de forma muy notable en la composición tanto del exoproteoma como del exopeptidoma de *Anabaena* sp. PCC7120 y abre una vía para llevar a cabo nuevos estudios sobre el papel de FurC en la regulación

de la biogénesis de las membranas y la comunicación de la cianobacteria con el exterior celular. Por otra parte, sería de interés investigar en el futuro si FurC regula directamente a alguno de los genes que codifican las proteínas cuya abundancia cambia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de FurC y su relación con la acumulación en el medio extracelular de anhidroMurNAc y GlcNAc-anhidroMurNAc, componentes principales de la capa de peptidoglicano.

# Discusión



## 5. Discusión

### 5.1. FurC es un regulador PerR en *Anabaena* sp. PCC7120 que experimenta varios niveles de oxidación.

La identificación y descubrimiento del mecanismo de acción de PerR (*Peroxide response Regulator*) de *B. subtilis* permitió su posterior descripción en otros organismos como *S. aureus*, *S. pyogenes* o la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 (Li et al., 2004, Bsat et al., 1998, Morikawa et al., 2006). Mas recientemente, Yingping et al. sugirieron que *furC* (*alr0957*) de *Anabaena* sp. PCC7120 correspondía al ortólogo PerR (Yingping et al., 2014). Esta conclusión se basó principalmente en el aumento de la transcripción de *furC* en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en la unión de FurC a los promotores de genes relacionados con el estrés oxidativo como la peroxirredoxina *prxA* y la sulfirredoxina *srxA*. En este mismo estudio se propuso que FurC podía sufrir el mecanismo de oxidación catalizada por metal (MCO), ya que ésta se inactivaba tras la incubación con Fe<sup>2+</sup> en condiciones aerobias. Sin embargo, en dicho trabajo no se presentaron evidencias bioquímicas de la oxidación de FurC que apoyaran esta hipótesis.

La optimización de la purificación de FurC realizada durante esta Tesis Doctoral permitió obtener proteína activa con alto grado de pureza en cantidad suficiente para llevar a cabo su caracterización bioquímica y estructural. Los resultados de MALDI-TOF que se recogen en el Capítulo 1 demostraron que tras la incubación de FurC con Fe<sup>2+</sup> en condiciones aerobias, ésta incorporaba un átomo de oxígeno por monómero a su estructura, lo que conducía a la inactivación irreversible de la proteína. Cuando FurC se incubó con Mn<sup>2+</sup> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la proteína no incorporó ningún átomo de oxígeno. Estos resultados proporcionaron evidencia directa de que FurC sufría MCO, un comportamiento ya descrito para otras proteínas PerR (Ji et al., 2015, Lee & Helmann, 2006b).

Otro de los aspectos que se ha estudiado en este trabajo es la capacidad de FurC para coordinar metales. A excepción de PerR de *L. interrogans*, que no presenta ningún átomo de zinc estructural, todas las proteínas PerR cuyas estructuras cristalográficas están resueltas contienen un átomo de zinc estructural coordinado por cuatro cisteínas organizadas en los típicos motivos CXXC (Jacquamet et al., 2009, Kebouchi et al., 2018, Makthal et al., 2013, Sarvan et al., 2018). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FurC con las secuencias de otras proteínas PerR cristalizadas hasta la fecha mostró que FurC no presentaba dichos motivos CXXC,

conservando únicamente la Cys103. A pesar de esto, se observó mediante ensayos de ICP-OES que la proteína tenía un átomo de zinc por monómero de FurC. Además, el tratamiento de FurC durante la primera etapa cromatográfica con el agente quelante de metales divalentes EDTA, no provocó la pérdida del átomo de zinc mencionado, lo que reforzó la hipótesis de que se trataba de un átomo de zinc unido con alta afinidad. Este hecho también se ha observado en otras proteínas de la familia FUR, en las que el tratamiento con EDTA no eliminaba el considerado zinc estructural, ya que al estar unido a la proteína con alta afinidad no era fácilmente captado por este agente quelante (Bsat & Helmann, 1999, Collet et al., 2003). Al objeto de identificar potenciales ligandos para el átomo de zinc de FurC detectado mediante ICP-OES, se han utilizado las herramientas AlphaFold y SWISS-MODEL para el modelado de la estructura tridimensional de este regulador. La combinación de ambas estrategias permitió proponer los posibles aminoácidos implicados en la coordinación del átomo de zinc estructural, que serían Cys103, Asp105, His144 y Asp147. Adicionalmente, los ensayos de calorimetría mostraron que FurC era capaz de interactuar con 1 mol de  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$  por mol de proteína. A pesar de que FurC interactuó con ambos metales mostrando afinidades similares, no se detectó el ion  $Mn^{2+}$  en los análisis por ICP de la proteína tratada con EDTA durante la purificación. Estos resultados sugerían que además del sitio de unión a Zn estructural, FurC presenta un segundo sitio de unión a metal que es capaz de incorporar  $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ . Dado el requerimiento de ambos metales en la actividad de unión de FurC al DNA, este segundo sitio correspondería con el sitio de unión a metal regulador. A pesar de que las proteínas PerR requieren la coordinación de los metales  $Fe^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  para su actividad, en PerR de *B. subtilis* también se ha reportado su unión al DNA en presencia de otros metales como el  $Co^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  (Herbig & Helmann, 2001). Además, se ha descrito recientemente que PerR de *B. subtilis* puede incorporar forzosamente  $Zn^{2+}$  en condiciones de exceso de este metal, lo que resulta en la incapacidad para reprimir al promotor del operón *hemAXCDBL* pero no a otros genes del regulón (Chandrangsu & Helmann, 2016). En vista de estos hechos, no se puede descartar que FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 pueda coordinar  $Zn^{2+}$  además de  $Mn^{2+}$  en su sitio regulador con un sentido fisiológico alternativo al de la función canónica de PerR.

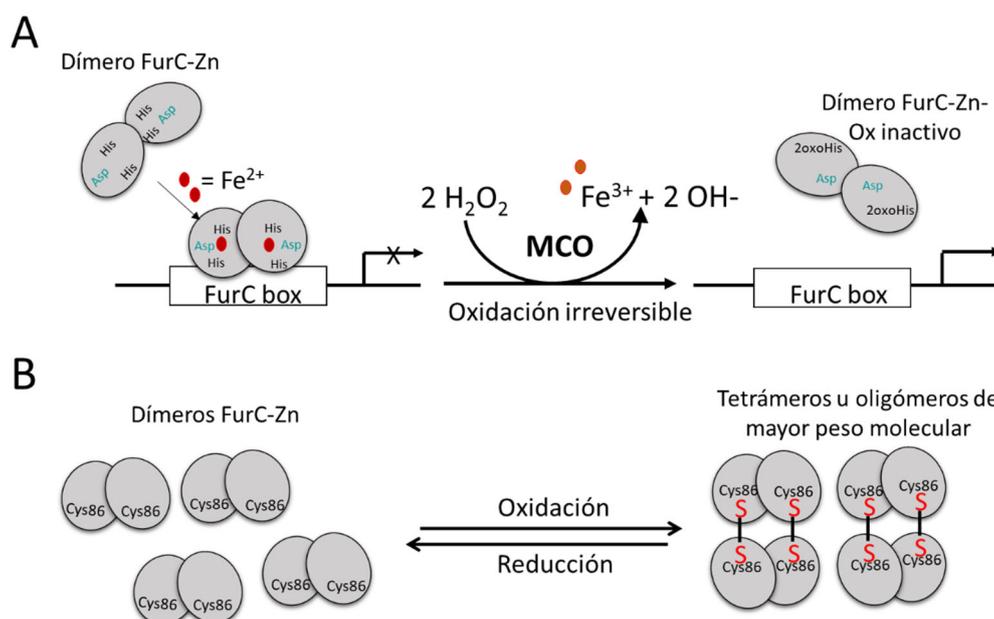
Cabe destacar que FurC puede unir ambos metales independientemente de su estado redox, sugiriendo que probablemente no existían cisteínas coordinando  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en el sitio regulador. Este hecho estaría de acuerdo con el modelo estructural generado en este trabajo, donde el metal regulador estaría coordinado por los residuos His45, His98, His100 y Asp111, conservados en la mayoría de las proteínas PerR, y un quinto aminoácido que no está conservado y que, dada su localización en los modelos de FurC propuestos, podría corresponder

al Asn93 o al Asp96. Entre los aminoácidos conservados, las His98 y His100 de FurC alinean con las His91 y His93 que sufren MCO en *B. subtilis*. Además, el Asp111 de FurC correspondería con el Asp104 de *B. subtilis*, considerado el aminoácido clave para la sensibilidad de la proteína frente a la MCO.

Además de las evidencias estructurales, en esta Tesis se presenta la primera evidencia *in vivo* del mecanismo de regulación de FurC en respuesta al estrés oxidativo. Además de las dianas de FurC descritas previamente, *srxA* y *prxA*, en este trabajo se observó que FurC regulaba directamente la expresión de las peroxirredoxinas *cgt3* (*alr2375*), *ahpC* (*all1541*) y *alr4404* en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los ensayos de Real Time RT-PCR mostraron que, tras una hora de incubación con 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el nivel de expresión de estas peroxirredoxinas aumentaba en la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre, mientras que los niveles de transcripción en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron similares a los de la cepa silvestre (*srxA* y *cgt3*) o incluso estaban reprimidos (*prxA* y *ahpC*). Este resultado es consistente con el modelo de mecanismo propuesto para las proteínas PerR, en el que FurC en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sufriría MCO, liberándose de sus promotores de forma irreversible y provocando la desrepresión de sus dianas (Figura 76.A).

Hasta este punto, la caracterización estructural y funcional de FurC confirmó su papel como regulador PerR de *Anabaena* sp. PCC7120. Sin embargo, se observaron características estructurales adicionales que indicaban que FurC podía sufrir otro nivel de oxidación además de la MCO. Los análisis de la oligomerización de FurC en condiciones nativas mediante SEC-MALLS-RI mostraron que la conformación más reducida de FurC era un dímero, observando además otras formas oligoméricas del regulador, como tetrámeros y formas de mayor peso molecular, que respondieron a la incubación con reductor y fuerza iónica disgregándose en la forma dimérica. Además, una vez aislada la forma dimérica de FurC, ésta respondía a la incubación con oxidantes formando de nuevo las formas de mayor peso molecular (tetrámeros, hexámeros y octámeros). La reversibilidad de la oxidación también se estudió mediante ensayos de retardo en gel. Estos resultados sugirieron que FurC podía integrar dos niveles de oxidación: la MCO en presencia de Fe<sup>2+</sup> en condiciones aeróbicas y que conducía a la inactivación irreversible del regulador (Figura 76.A), y la oxidación reversible e independiente de metal, que podría ocurrir en situaciones de una baja ratio Fe<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>, donde predominaría la forma FurC:Zn,Mn, insensible a la MCO (Yingping et al., 2014) (Figura 76.B).

De esta forma, un mecanismo de reacción al estrés oxidativo en condiciones de deficiencia de hierro transitorias provocaría la inactivación reversible de FurC mediante la formación de tetrámeros u otras formas oligoméricas de mayor peso molecular a partir de puentes disulfuro entre dímeros de FurC. Los modelos tridimensionales de la estructura del tetrámero de FurC permitieron proponer que la Cys86 es el residuo clave para la formación de estos puentes disulfuro entre dímeros de FurC.



**Figura 76. Representación esquemática de los dos niveles de oxidación integrados por FurC.** A) Mecanismo canónico de PerR de la inactivación irreversible de la proteína vía (MCO). B) Oxidación reversible de FurC a través de la oligomerización mediante la formación de puentes disulfuro.

En resumen, los resultados derivados de esta Tesis Doctoral demuestran que FurC incorpora un átomo de oxígeno mediante MCO y aportan la primera evidencia *in vivo* de que FurC corresponde al regulador PerR en *Anabaena*. sp PCC7120. Además, nuevas evidencias estructurales sugirieron que FurC podía llevar a cabo un mecanismo de acción adicional al canónico, integrando un tipo de oxidación reversible a través de la formación de puentes disulfuro entre dímeros de FurC. Dada la participación de FurC en procesos celulares diferentes a la respuesta a  $H_2O_2$  que se describen en esta Tesis Doctoral y que se discutirán más adelante, no es de extrañar que FurC pueda presentar un mecanismo de regulación diferente al modo de acción canónico de PerR que le permita integrar otro tipo de señales.

## 5.2. Impacto de la sobreexpresión de *furC* en la fisiología de *Anabaena* sp. PCC7120: implicación de FurC en la regulación de la división celular y la fotosíntesis.

La mayoría de las proteínas FUR juegan un papel clave en la fisiología de las cianobacterias, regulando la expresión de genes involucrados en múltiples procesos metabólicos y de señalización. Ante la imposibilidad de trabajos previos de generar un mutante de delección de *furC*, en este trabajo se utilizó una estirpe de sobreexpresión de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120 (EB2770FurC) generada previamente en nuestro laboratorio. Además de las diferencias en aspectos relacionados con la respuesta a estrés oxidativo discutidos anteriormente, los primeros resultados de la caracterización fenotípica de esta estirpe indicaron que la sobreexpresión de *furC* producía importantes alteraciones morfológicas y fisiológicas en las células de *Anabaena* sp. PCC7120. Algunas de las diferencias más notables observadas entre la estirpe EB2770FurC y la estirpe silvestre fueron una mayor tasa de crecimiento y alteraciones en la morfología. Estos cambios podrían relacionarse con la activación directa por parte de FurC de la expresión de los genes *ftsZ* y *ftsH*, anotados en las bases de datos como “*cell division protein*”. FtsZ es un homólogo de la tubulina que está presente en la mayoría de las bacterias y cloroplastos y juega un papel importante en la división celular (Osteryoung et al., 1998). En células de *Anabaena* sp. PCC7120, FtsZ se acumula en el borde de los tabiques de división para formar el característico anillo Z procariótico. Además, la delección de FtsZ en *Anabaena* sp. PCC7120 da lugar a una división celular asimétrica y ralentizada, provocando alteraciones en la morfología celular (Corrales-Guerrero et al., 2018). No obstante, factores como la presencia de ROS, tienen un gran impacto sobre la morfología de cianobacterias (Montgomery, 2015), por lo que no se puede descartar que los cambios observados puedan deberse a otros factores.

Ensayos de EMSA y análisis de Real Time RT-PCR mostraron que FurC también activaba directamente la expresión de la proteína FtsH (*all4776*). Las proteínas FtsH son las principales metaloproteasas en las membranas fotosintéticas y son esenciales para mantener la homeostasis proteica mediante la eliminación de proteínas fotooxidadas y mal plegadas (Kato et al., 2018). Dado que se observó que las células EB2770FurC se dividían más rápido que las de tipo silvestre, el aumento en la transcripción de *ftsH* se correlacionaría bien con las necesidades fisiológicas de la célula para la reorganización de los nuevos septos y membranas fotosintéticas. Además, como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, FtsH se encarga de la degradación del polipéptido D1 dañado, como parte del ciclo de reparación del PSII (Kato et

al., 2018, Malnoë et al., 2014). Los resultados de este trabajo mostraron una disminución en los niveles del polipéptido D1 en células de EB2770FurC, lo que concordaría perfectamente con la activación de *ftsH* por parte de FurC. En la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 se ha descrito que contiene cuatro subunidades FtsH (FtsH1-4) que se ensamblan en homo y heterocomplejos específicos. El complejo FtsH2/3, localizado en la membrana tilacoidal, ejerce la degradación del polipéptido D1 del centro de reacción fotosintético y el control general de calidad de PSII (Boehm et al., 2012). A pesar de la función tan importante que presentan las proteasas FtsH, se desconocen los factores implicados en la regulación de su expresión. No obstante, Krynická et al han demostrado la relación de las proteasas FtsH con la familia FUR. En *Synechocystis* sp. PCC6803, el complejo FtsH1/3 se localiza en la membrana citoplásmica y está implicado en la regulación de la respuesta a deficiencia de hierro, tarea que efectúa por medio de la degradación de Fur (Krynická et al., 2014). En *Anabaena* sp. PCC7120 además de la diana directa de FurC *all4776*, podemos encontrar otros 3 ortólogos de FtsH (Gong & Xu, 2012), pero se desconoce la función específica de cada uno.

Adicionalmente, el análisis del contenido en pigmentos de la estirpe de sobreexpresión de *furC* mostró que en fase exponencial presentaba menor contenido en clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenos y exhibía una menor ratio ficobiliproteínas /clorofila *a* por célula que *Anabaena* sp. PCC7120. Sin embargo, en fase estacionaria mientras que la composición en clorofila *a* y ficobiliproteínas se mantenía en menor nivel en EB2770FurC con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120, la composición en carotenoides aumentó en EB2770FurC. Este hecho podría explicarse como un efecto compensatorio de la menor eficiencia fotosintética de *furC*, para proteger al aparato fotosintético en la fase estacionaria cuando existen mayores niveles de ROS. Como se discutirá en los próximos apartados, estas alteraciones fenotípicas podrían relacionarse con los cambios en la expresión génica en los que se demostró que FurC regulaba directamente la expresión de genes que codifican proteínas estructurales del ficobilisoma o el PSII. En cuanto a las alteraciones observadas en la eficiencia fotosintética de la estirpe sobreexpresión de *furC*, como la menor tasa fotosintética, o la disminución en la transferencia de energía al PSII, estas podrían relacionarse con el menor contenido en pigmentos observado y con la activación transcripcional de la metaloproteasa FtsH mediada por FurC. No obstante, no se puede descartar que los cambios observados puedan ser consecuencia de una alteración del contenido en ROS en la estirpe EB2770FurC, ya que como se discutía anteriormente, la sobreexpresión de *furC* conducía a la desregulación de los genes de respuesta frente al estrés oxidativo y a una menor tolerancia frente a éste. De hecho, la disminución de la tasa fotosintética observada en EB2770FurC, estaba acompañada de una mayor tasa de respiración.

Ambas respuestas podrían funcionar como mecanismo para aliviar la posible tensión de oxígeno presente en células EB2770FurC. A pesar de esto, el aumento de la respiración observada en EB2770FurC podría tratarse de un efecto compensatorio para equilibrar el nivel de ATP de la célula, dada la menor actividad fotosintética. En resumen, los resultados mostrados en este trabajo demuestran que la sobreexpresión de *furC* tiene un gran impacto sobre la fisiología de *Anabaena* sp. PCC7120, afectando a su crecimiento, morfología, composición en pigmentos y eficiencia fotosintética. Además, estos estudios llevaron a describir el papel de FurC como regulador transcripcional de genes relacionados con la división celular, como *ftsZ* y con la fotosíntesis, como la metaloproteasa *ftsH* involucrada en el ciclo de reparación del PSII y varias subunidades estructurales del ficobilisoma.

### 5.3. FurC es un regulador global en *Anabaena* sp. PCC7120.

Como se comentaba en la Introducción, el regulón de las proteínas PerR estudiadas hasta la fecha comprendía principalmente genes involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo y en la adquisición y transporte de hierro. En cianobacterias, hasta la realización de este trabajo únicamente se había descrito el regulón de PerR en *Synechocystis* sp. PCC6803, que incluye genes de respuesta al estrés oxidativo como *sodB* y *ahpC*, así como otros relacionados con la homeostasis del hierro como *mrgA* o *isiA* e *idiA* que parecen ser específicos de cianobacterias (Li et al., 2004). El regulador PerR de esta cianobacteria no es esencial, al contrario que en *Anabaena* sp. PCC7120, lo que podría sugerir la implicación de FurC en un rango más amplio de procesos.

Como primera aproximación para conocer el regulón de FurC se realizaron estudios de transcriptómica diferencial de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) y de *Anabaena* sp. PCC7120. Esta comparativa se efectuó también en condiciones de deficiencia de nitrógeno, cuyos resultados se discuten en el siguiente apartado. Los resultados del RNA-seq comparando el perfil transcripcional de la estirpe de sobreexpresión de *furC* con el de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar permitieron identificar 197 genes que tenían su expresión alterada  $\pm 1,5 \text{ Log}_2$  (*fold change*). Como se podía esperar, varios genes diferencialmente expresados en la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC estaban relacionados con el mantenimiento del estado redox de la célula, como *alr2142* que codifica una oxidorreductasa, *prxA*, peroxirredoxina previamente descrita como diana de FurC, *alr4686*, que codifica al citocromo P450 y *alr7354* que codifica la enzima glutatión S-transferasa.

Adicionalmente, la sobreexpresión de *furC* alteró la expresión de dos operones relacionados con la captación de hierro, el sistema Fec codificado por *alr4028-33* y FutABC (Stevanovic et al., 2012). Los ensayos de retardo en gel evidenciaron que FurC era capaz de unirse al promotor del operón *alr4028-33* (sistema Fec). Este operón está compuesto por un receptor dependiente de TonB (*alr4028-29*), una ferredoxina putativa (*alr4030*) y tres genes que codifican las subunidades de un transportador de Fe<sup>3+</sup> de tipo ABC, FecB (*alr4031*), FecD3 (*alr4032*) y FecE3 (*alr4033*). De manera similar, la expresión de otros genes implicados en la captación de hierro como *iacT*, *schE*, *all1100* y otras proteínas periplásmicas, estaba afectada en la cepa EB2770FurC. No obstante, FurC no fue capaz de unirse al promotor de estos genes, lo que sugería que su expresión podía estar regulada indirectamente. En conjunto, estos resultados sugieren que FurC podría desempeñar, como otros ortólogos PerR presentes en otras bacterias, un papel clave en el transporte y la captación de hierro en *Anabaena* sp. PCC7120.

Cabe destacar que la expresión de varios genes relacionados con la fotosíntesis, incluyendo genes del PSI, PSII y de la síntesis de carotenoides, estaba alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC*. En concreto los niveles de *wcaG*, gen involucrado en la síntesis de carotenoides, disminuyeron en EB2770FurC -2,9 veces. Este cambio en la expresión podía relacionarse con la disminución en fase exponencial de crecimiento de la composición de carotenoides en EB2770FurC con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120. Los ensayos de retardo en gel sobre los promotores de este conjunto de genes permitieron identificar a *psbAIV* como diana directa de FurC. El gen *psbAIV* codifica una de las copias de la proteína D1 del PSII de *Anabaena* sp. PCC7120 y su transcripción está reprimida hasta -22,9 veces en EB2770FurC. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de *psbAIV* podría constituir otro nivel de regulación del ciclo de reparación del PSII más allá del control de la expresión de *ftsH* discutido anteriormente.

Por último, los datos de RNA-seq en combinación con ensayos de EMSA permitieron identificar también como dianas de FurC a dos reguladores transcripcionales no caracterizados previamente, *all7016* y *alr9013* y a los genes que conforman el operón *all3914-13* que codifica las subunidades alfa y beta de la enzima succinil-CoA sintetasa, la cual cataliza la interconversión de succinil-CoA a succinato en el ciclo de Krebs. Este último hallazgo sugería la posible implicación de FurC en el metabolismo del carbono. Esta hipótesis se corroboró con los resultados expuestos en el Capítulo 4 y que se discuten en el siguiente apartado. En conjunto, los análisis de RNA-seq mostraron concordancia con los resultados obtenidos de la

caracterización fenotípica de la estirpe EB2770FurC y permitieron identificar nuevas funciones de FurC como regulador implicado en procesos más allá de la respuesta al estrés oxidativo.

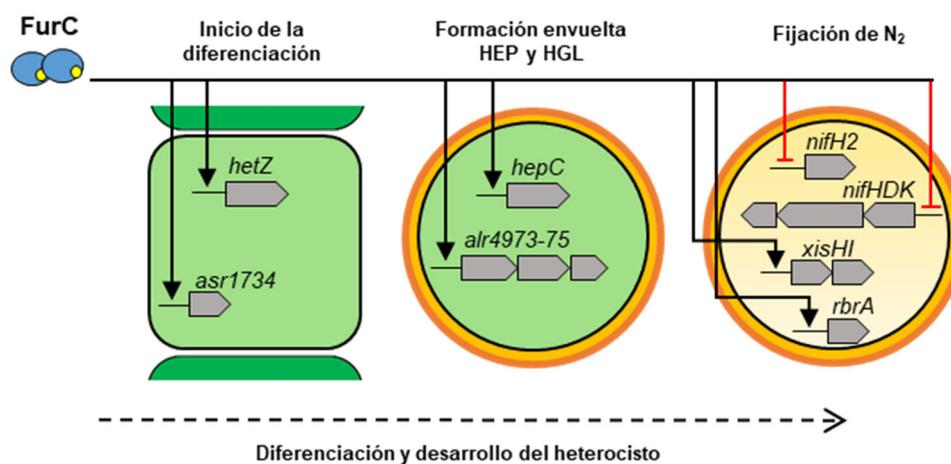
#### **5.4. FurC/PerR, un regulador transcripcional involucrado en el control del balance C/N.**

El metabolismo del nitrógeno y del carbono están estrechamente interconectados para asegurar el correcto balance entre estos nutrientes, necesario para el crecimiento y funcionamiento de las células (Zhang et al., 2018a). Como se comentaba en la Introducción, existen distintos niveles de regulación de estos procesos que funcionan sincrónicamente para garantizar la incorporación y asimilación de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Daley et al., 2012, Herrero et al., 2004).

Ante la deficiencia de nitrógeno combinado, la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 y otras cianobacterias filamentosas son capaces de diferenciar heterocistos para realizar la fijación de N<sub>2</sub>. La incapacidad para diferenciar heterocistos de la estirpe de sobreexpresión de *furC* mostrada en este trabajo, motivó el estudio de la participación de FurC en la regulación de genes potencialmente implicados en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno. Mientras que el perfil transcripcional de la estirpe de sobreexpresión de *furC* frente al de *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones estándar mostró cambios en la expresión de 197 genes, en condiciones de deficiencia de nitrógeno el número de genes diferencialmente expresados aumentó hasta 504. Uno de los grupos afectados fue el de genes relacionados con la fotosíntesis. En condiciones estándar estaban desregulados 7 genes pertenecientes a esta categoría funcional, mientras que en condiciones de deficiencia de nitrógeno cambiaron 32 genes. Entre éstos últimos, se observó la disminución en la expresión de varios genes que codificaban proteínas del ficobilisoma y que habían sido descritas previamente como dianas directas de FurC (Capítulo 2). Además, también disminuyó la expresión de varios genes que codifican proteínas del PSI y PSII, como *psbA/IV*. Es bien sabido que en los heterocistos se desmantela el PSII para reducir la producción de oxígeno y proteger así a la nitrogenasa (Wolk et al., 1994), por lo que estos resultados podrían apuntar a una posible participación de la FurC en la regulación de este proceso.

Además de los genes relacionados con la fotosíntesis, cabe destacar el gran número de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno cuyos niveles de transcripción estaban afectados en la variante de sobreexpresión de *furC*. En conjunto, los resultados mostrados en el Capítulo 3 permitieron describir 8 nuevas dianas de FurC relacionadas con el metabolismo del nitrógeno,

demostrando su participación en la regulación génica de las distintas etapas del proceso de diferenciación del heterocisto. En la Figura 77 se muestra un esquema resumen de la implicación de FurC en la regulación de genes que participan en la diferenciación y desarrollo del heterocisto.



**Figura 77.** Esquema general de la regulación transcripcional ejercida por FurC sobre las dianas que participan en las diferentes fases de la diferenciación del heterocisto en *Anabaena* sp. PCC7120. La activación transcripcional por parte de FurC se presenta con una flecha negra y la represión con una flecha truncada roja.

Por una parte, se observó que FurC regulaba directamente a reguladores implicados en el comienzo de la diferenciación del heterocisto como *hetZ* o *asr1734*. HetZ, es un elemento regulador clave para el desarrollo del heterocisto dado que promueve su diferenciación a través de la interacción proteína-proteína con HetR y HetP (Videau et al., 2018). En cuanto a Asr1734, éste es un regulador negativo de la diferenciación del heterocisto, cuya sobreexpresión en *Anabaena* provoca la inhibición de su formación (Wu et al., 2007). Por otra parte, los resultados demostraron que FurC regulaba directamente a genes implicados en la síntesis de las capas de polisacáridos (HEP) y glicolípidos (HGL) que constituyen la envuelta del heterocisto, como *hepC* y el operón *alr4973-75*. HepC es una glicosiltransferasa que participa en la formación de la capa HEP (Wolk, 1994). El operón *alr4973-75* por su parte codifica uno de los homólogos de DevBCA en *Anabaena* sp. PCC7120. Las proteínas DevBCA están involucradas en la deposición de glicolípidos específicos de heterocistos en la capa HGL (Staron, 2012).

Una posible explicación para la incapacidad de formar heterocistos observada en EB2770FurC podría ser que la desregulación de estas dianas de FurC relacionadas con la diferenciación y el desarrollo de la envuelta del heterocisto obstaculice su correcto desarrollo.

Además, la activación de *asr1734* a través de FurC podría constituir un factor determinante para la inhibición de la formación de heterocisto ya que se ha publicado que la sobreexpresión de esta proteína provoca la ausencia de heterocistos en *Anabaena* sp. PCC7120 (Wu et al., 2007).

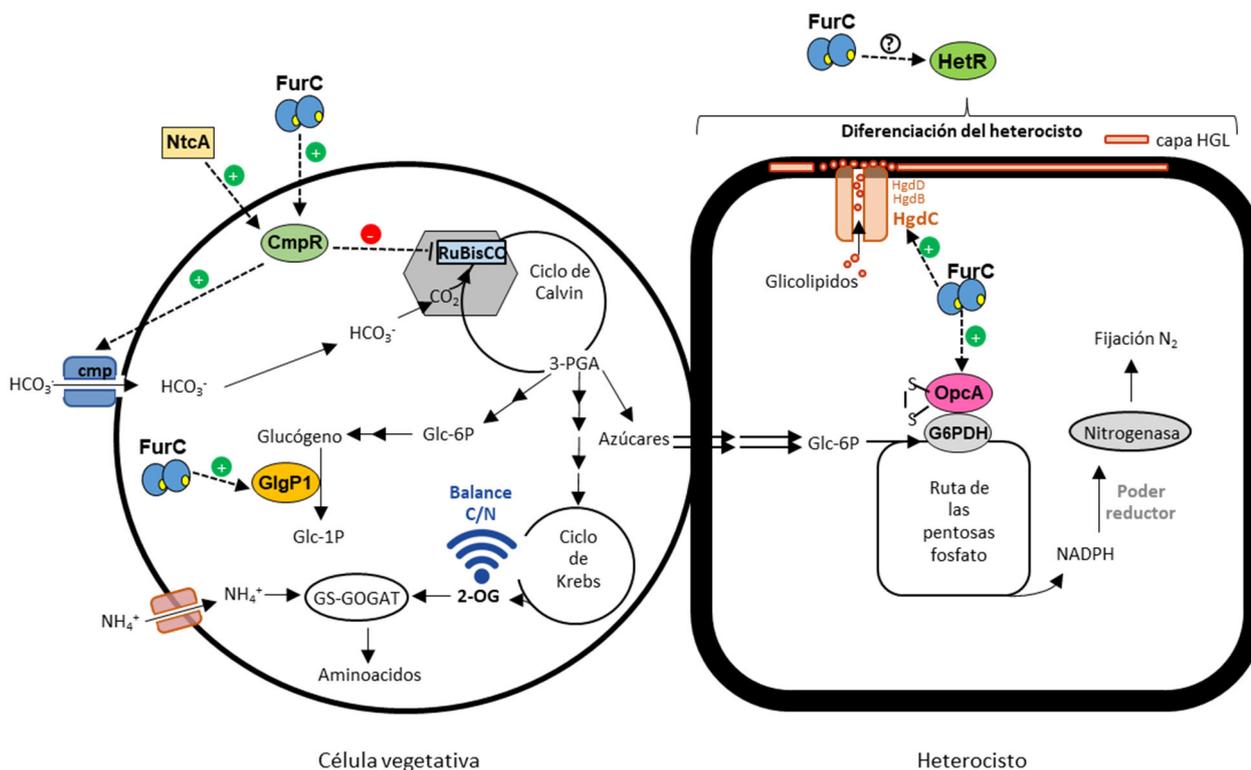
En la última etapa de la diferenciación del heterocisto, se expresan las proteínas relacionadas con el proceso de fijación de nitrógeno. En este trabajo se demostró muy fehacientemente que FurC también controlaba la expresión de varios genes implicados en este proceso. En concreto FurC reprimía al operón *nifHDK* que codifica las subunidades de la nitrogenasa en *Anabaena* sp. PCC7120 (Mazur et al., 1980, Rice et al., 1982) y a una copia del gen *nifH*, llamada *nifH2*. A pesar de que *nifH2* es prácticamente idéntica a *nifH*, su entorno genético carece de las copias de los genes que codifican las otras subunidades estructurales *nifD* y *nifK* como sí presenta *nifH* (Haselkorn, 1986). No obstante, su expresión aumenta en deficiencia de nitrógeno, lo que sugiere su implicación en la respuesta adaptativa de *Anabaena* sp. PCC7120 a este estrés (Flaherty et al., 2011). Por otro lado, FurC también activaba al operón *xisHI*, que codifica dos proteínas que controlan a la recombinasa XisF, permitiendo así la expresión de la ferredoxina del heterocisto (Kumar et al., 2019). Finalmente, se observó que FurC regulaba al gen de la rubreritina A, *rbrA*. Este gen codifica una peroxidasa implicada en la protección de la nitrogenasa frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en heterocistos (Zhao et al., 2007b).

Como se comentaba anteriormente, los análisis de RNA-seq de la estirpe de sobreexpresión de *furC* en combinación con ensayos de retardo en gel permitieron describir 8 nuevas dianas de FurC relacionadas con la diferenciación del heterocisto y la fijación de nitrógeno. Esta información, junto con el análisis de las demás dianas directas de FurC descritas hasta el momento se utilizó para definir la secuencia consenso de unión a DNA de este regulador (5'-CAAATCATAACGACTTTG-3'). La descripción de esta secuencia de unión posibilitó la construcción de una matriz de búsqueda para nuevos sitios de unión de FurC en todo el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. La predicción *in silico* validada mediante ensayos de retardo en gel y análisis de Real Time RT-PCR permitió identificar 19 nuevas dianas de FurC, entre ellas, tres genes importantes relacionados con el metabolismo del nitrógeno (*hgdC*, *ancrpB* y *hetR*). El gen *hgdC* codifica una subunidad del transportador HgdBC que participa en la formación de la capa HGL del heterocisto (Shvarev et al., 2018). Por otro lado, *ancrpB* codifica un regulador transcripcional presuntamente implicado en el control de genes relacionados con la deficiencia de nitrógeno (Higo et al., 2007). En ambos casos, FurC estaría actuando como activador transcripcional. Sin embargo, uno de los hallazgos más interesantes que se pudo extraer de este trabajo fue que FurC parecía regular de forma directa la expresión de *hetR*. Como se comentaba

en la Introducción, HetR se considera uno de los reguladores transcripcionales más importantes en el desarrollo del heterocisto ya que activa la expresión de varios genes indispensables para que tenga lugar la diferenciación. Hasta la fecha, únicamente se había descrito a NrrA como regulador directo de la expresión génica de *hetR*. NrrA se activa mediante NtcA y actúa posteriormente activando la expresión de HetR (Ehira & Ohmori, 2006b, Ehira & Ohmori, 2006a). Además, se ha demostrado que FurA, un parólogo de FurC en *Anabaena* sp. PCC7120, es capaz de unirse a la región promotora de *hetR* (Gonzalez et al., 2013). Por otro lado, se han propuesto otros mecanismos de regulación *hetR* a nivel postranscripcional. Entre ellos, el control por fosforilación de la oligomerización de HetR y su actividad funcional (Valladares et al., 2016) y la interacción con las proteínas PatS, PatX y HetN a través del pentapéptido RG(S/T)GR, que tiene un efecto negativo sobre la actividad de HetR (Khudyakov et al., 2020, Feldmann et al., 2011).

Los resultados de esta Tesis mostraron que la expresión de *hetR* en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a la estirpe silvestre estaba alterada, evidenciando que FurC regula su expresión. Cabe mencionar que en condiciones estándar de cultivo el cambio en la expresión (*fold change*) de *hetR* entre la estirpe de sobreexpresión de *furC* y *Anabaena* sp. PCC7120, variaba a lo largo del tiempo de experimento. Con un cambio de aprox. 2 veces en EB2770FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 al cabo de una hora desde el inicio del experimento, hasta un cambio de -1,5 veces tras 48 h. Esta variación en el cambio transcripcional podría deberse a cambios en las señales que modulan la actividad de FurC (estado redox, disponibilidad de metales o 2-OG) a lo largo del tiempo, dando lugar a alteraciones en el patrón de transcripción de *hetR* en la estirpe de sobreexpresión de *furC*. No obstante, sería necesario llevar a cabo otros experimentos complementarios para esclarecer esta cuestión.

Respecto al metabolismo del carbono, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que FurC regulaba directamente la expresión de *glgP1*, *cmpR* y *opcA* activando su transcripción. Curiosamente estos genes tienen funciones que interconectan el metabolismo del carbono con el de nitrógeno. En la Figura 78 se puede observar un esquema que resume la participación de FurC en la regulación de sus nuevas dianas directas relacionadas con el balance C/N en *Anabaena* sp. PCC7120.



**Figura 78. Diagrama general de la regulación ejercida por FurC de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del nitrógeno y carbono en *Anabaena* sp. PCC7120.** Se representan una célula vegetativa y el heterocisto para muestra los procesos llevados a cabo en ambas células. Las líneas discontinuas indican la regulación transcripcional. Los símbolos (+) y (-) indican la activación o represión transcripcional respectivamente. 3-PGA: 3-fosfoglicerato; Glc-6P: glucosa-6-fosfato; Glc-1P: glucosa-1-fosfato; G6PDH: glucose-6-fosfato deshidrogenasa.

GlgP1, es una glucógeno fosforilasa implicada en la degradación del glucógeno a monómeros de glucosa-1-fosfato. Las células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC7120 almacenan reservas de carbono procedente de la fotosíntesis en forma de glucógeno que utilizan como fuente de carbono y energía en respuesta a situaciones de estrés y deficiencia de nutrientes. Por otra parte, como en los heterocistos no se realiza la fotosíntesis completa, las células vegetativas abastecen al heterocisto de ATP y poder reductor derivado de los carbohidratos que, en parte, podrían derivar de la degradación del glucógeno. De hecho, el regulador de respuesta a nitrógeno *NrrA* es capaz de unirse al promotor de *glgP1*, controlando el proceso de degradación de glucógeno y conectando el control del metabolismo del glucógeno con la fijación de nitrógeno (Ehira & Ohmori, 2011, Ernst et al., 1990).

Por otro lado, se encontró que FurC activaba directamente la expresión de *cmpR*. *CmpR* es un regulador transcripcional requerido para la activación de la expresión del clúster *alr2877-alr2880* que codifica al transportador de bicarbonato *Cmp* (Lopez-Igual et al., 2012). El

transportador Cmp se expresa en condiciones de deficiencia de carbono y está implicado en los mecanismos CCM, encargados de concentrar el carbono en forma de CO<sub>2</sub>, favoreciendo su fijación por la enzima RuBisCO. (Price et al., 2008). De manera adicional, se ha sugerido que CmpR también podría ser un regulador negativo del operón *rbcL* que codifica las subunidades de la enzima RuBisCO (Lopez-Igual et al., 2012). La expresión de CmpR está a su vez regulada por NtcA, el regulador global del metabolismo del nitrógeno, lo que de nuevo deja constancia de la regulación cruzada entre las redes reguladoras del metabolismo del nitrógeno y del carbono (Lopez-Igual et al., 2012) (Figura 78).

Por último, se encontró que FurC activaba directamente la expresión de *opcA*. La proteína redox OpcA actúa como un activador alostérico de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Mihara et al., 2018, Mihara et al., 2020). G6PDH es la primera enzima de la ruta de las pentosas fosfato y es esencial para la fijación de nitrógeno, debido a que esta ruta provee poder reductor para la nitrogenasa en el heterocisto en forma de NADPH (Winkenbach & Wolk, 1973, Apte S.K., 1978) (Figura 78).

La gran cantidad de dianas descritas para FurC relacionadas con procesos dependientes de la ratio C/N sugería que FurC podría estar detectando de alguna forma este balance. Los resultados que se presentan en el Capítulo 4 de esta Tesis nos permitieron confirmar que FurC era capaz de unirse a 2-oxoglutarato (2-OG) en presencia de Mn<sup>2+</sup> y DTT. El 2-OG es un metabolito que proporciona información acerca del balance C/N dado que conecta el ciclo de Krebs con el ciclo GS-GOGAT (Figura 78). Es interesante comentar que las condiciones en las que FurC se unía al 2-OG (presencia de Mn<sup>2+</sup> y DTT), son precisamente las condiciones que requiere FurC para la unión específica al DNA, lo que apuntaba a que el 2-OG podía actuar como modulador de esta actividad, así como lo hace en otros reguladores transcripcionales implicados control del balance C/N como NtcA, PII y NdhR (Forcada-Nadal et al., 2018, Jiang et al., 2018). De acuerdo con esta hipótesis, los análisis de retardo en gel mostraron que la presencia de 2-OG incrementaba la afinidad de FurC por los promotores de *hetZ*, *hepC* y *hgdC*. Además, este incremento de la afinidad provocado por el 2-OG sería consistente con los resultados de RNA-seq expuestos en el Capítulo 3 que mostraban cambios en la expresión de 170 genes en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a la estirpe silvestre únicamente en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Por último, una de las conclusiones que se puede extraer de todos los resultados presentados en esta memoria es que FurC actúa como un represor sobre las dianas relacionadas con la

función canónica de las proteínas PerR (i.e. *prxA*, *srxA* o *ahpC*). Sin embargo, FurC parecía funcionar como activador de la transcripción de la mayoría de las otras dianas identificadas en este trabajo. En los casos en los que FurC actuaba como activador se observó que la caja FurC se localizaba en una posición lejana respecto de la caja TATA en los promotores de estas dianas. Además, FurC presentaba mayor afinidad por los genes relacionados con la función canónica de FurC (PerR) como *prxA*, *srxA* y *ahpC*, y, sin embargo, la afinidad de FurC por varios genes relacionados en el metabolismo del nitrógeno y el carbono era inferior y requería de la adicción de  $MnCl_2$  en el gel y el tampón de electroforesis para observar correctamente la unión. Este hecho sugería que FurC podría priorizar la regulación de unos genes frente a otros dependiendo de varios factores, como el estado redox, la disponibilidad de metal o la disponibilidad de 2-OG. Como se comentaba en la Introducción, en *B. subtilis* también se ha descrito que PerR regula selectivamente diferentes promotores en función de la ratio  $Fe^{2+}/Mn^{2+}$  (Pinochet-Barros & Helmann, 2018).

En conclusión, los resultados obtenidos de este trabajo permitieron identificar un total de 15 nuevas dianas de FurC relacionadas con los metabolismos del nitrógeno y del carbono. Además, los resultados obtenidos sugieren que FurC podría integrar varias señales para conseguir una regulación fina de la transcripción de estas dianas. Algunas de estas señales serían señales canónicas y bien definidas para proteínas PerR, como la disponibilidad de metal o el estado redox. Sin embargo, en este trabajo hemos definido nuevas señales como el 2-OG, el cual informa acerca del balance C/N de la célula.

### **5.5. La sobreexpresión de *furC* altera los perfiles del exoproteoma y exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120**

Para estudiar las diferencias en la composición del exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120 se utilizó la técnica de proteómica SWATH-MS que permitió identificar 213 proteínas con cambios significativos en su abundancia. Cabe destacar que únicamente el 26 % de estas proteínas habían sido identificadas previamente en las fracciones del exoproteoma y/o secretoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (Oliveira et al., 2015, Hahn et al., 2015), por lo que este análisis aportó 163 nuevas proteínas al conocimiento general del exoproteoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Entre ellas, 53 presentaban un péptido señal por lo que probablemente puedan ser secretadas de forma activa por *Anabaena* sp. PCC7120. La razón por la que el número de proteínas identificadas en este estudio es considerablemente mayor que en trabajos anteriores puede deberse a que se han

utilizado diferentes técnicas. Los estudios anteriores del exoproteoma y secretoma de *Anabaena* sp. PCC7120 utilizaron técnicas de proteómica dirigida, que a pesar de ser una poderosa herramienta de investigación que ofrece resultados reproducibles, está limitada en el número de proteínas que pueden detectarse en una muestra. Sin embargo, la técnica SWATH-MS utilizada en este trabajo no tiene esta limitación, por lo que aumenta enormemente el rendimiento de identificación/cuantificación de los péptidos presentes en una muestra. Además, hay que tener en cuenta que en este caso se realizó una comparativa relativa, por lo que solo se presentan las proteínas con una abundancia diferencial entre las dos estirpes del estudio, descartando un gran número de proteínas que no cumplían con los parámetros estadísticos aplicados para medir la tasa de cambio, lo que sugiere que el alcance de esta técnica puede ser aún mayor.

Los resultados de SWATH mostraron que la sobreexpresión de *furC* afectaba directa o indirectamente a la abundancia de proteínas en el exoproteoma de *Anabaena* sp. involucradas en varios procesos funcionales incluyendo aquellos donde FurC había mostrado una fuerte implicación (Capítulos 2, 3 y 4) como la fotosíntesis y respiración, el metabolismo del carbono o la respuesta al estrés oxidativo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la abundancia de estas proteínas en el exoproteoma no solo depende de su transcripción dentro de la célula, sino que también intervienen procesos postranscripcionales y procesos de secreción y acumulación en el medio celular. Este hecho podría explicar que de las 213 proteínas cuya abundancia relativa era diferente en ambas cepas, solo los genes de 28 de ellas presentaron diferencias en la expresión en la estirpe de sobreexpresión de *furC* respecto a la estirpe silvestre, de acuerdo con los análisis de RNA-seq (Capítulo 3). Además, dentro de éstas, únicamente 9 genes (aproximadamente un 30 %) mostraron la misma tendencia de incremento o disminución en su abundancia y expresión génica.

Por otro lado, la construcción de una red de interacción utilizando STRING con los datos obtenidos por SWATH-MS puso de manifiesto la presencia de varios clústeres de interacción de proteínas sobrerrepresentadas en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*. Entre ellos, un clúster principal con la proteína TrxA1 situada en el centro conectando varios grupos de proteínas sobrerrepresentadas a su vez en el exoproteoma en la estirpe de sobreexpresión de *furC* y que estaban implicadas en procesos como la fotosíntesis, el metabolismo del carbono o la traducción. En *Synechocystis* sp. PCC6803 se han descrito numerosas proteínas que interaccionan con TrxA, incluyendo varias localizadas en la membrana tilacoidal y citoplasmática (Mata-Cabana et al., 2007, Lindahl & Kieselbach, 2009). Además, la reducción de los niveles de

TrxA en esta cianobacteria afecta a la fotosíntesis, la fijación de carbono y al nivel de estrés oxidativo (Mallén-Ponce et al., 2021). Los resultados presentados en esta tesis doctoral son la primera evidencia de la presencia de TrxA en el medio extracelular de *Anabaena* sp. PCC7120. En cianobacterias, únicamente se ha detectado TrxA en el exoproteoma de *Nostoc flageliforme* (Wang et al., 2020). El hecho de que TrxA esté en mayor abundancia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* junto con 17 de sus posibles *partners*, los cuales también están sobrerrepresentados, podría sugerir que la sobreexpresión de *furC* provoca la desregulación o modifica la secreción al medio extracelular de TrxA y parte de su complejo sistema de interacción. Como se discutía anteriormente, la estirpe de sobreexpresión de *furC* presenta una menor tolerancia al estrés oxidativo, por lo que se podría sugerir que la presencia de TrxA y otras enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como CatB, PrxA y SodB en mayor abundancia en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* sea un efecto compensatorio para paliar el estrés oxidativo que parecen sufrir las células de EB2770FurC.

Otro aspecto que llamó la atención del exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* fue la disminución en la abundancia de proteínas relacionadas con la pared celular, entre ellas el transportador TolC de membrana HgdD. HgdD ha sido descrito como un transportador de proteínas, glicolípidos y sideróforos y constituye el mayor componente de la secreción de metabolitos de *Anabaena* sp. PCC7120 (Hahn et al., 2015, Moslavac et al., 2007a, Nicolaisen et al., 2010b, Hahn et al., 2012). De hecho, en su faceta como modulador del patrón de secreción de proteínas, se observó que un mutante de delección de *hgdD* presentaba diferencias en significativas en el secretoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (Hahn et al., 2015). Por lo tanto, no se puede descartar que algunas de las diferencias observadas en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* se deban a la disminución de los niveles de HgdC.

Otras proteínas relacionadas con la pared celular cuya abundancia era menor en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*, fueron las amidasas de mureína AmiC1 (*alr0092*) y AmiC2 (*alr0092*) implicadas en la remodelación de la capa de peptidoglicano y la formación de nanoporos. En condiciones de deficiencia de nitrógeno, *Anabaena* sp. PCC7120 requiere de un correcto transporte e intercambio de metabolitos entre las células vegetativas y el heterocisto. Una ruta para este intercambio es a través de unas estructuras proteicas llamadas uniones septales que conectan el citoplasma de células adyacentes atravesando las perforaciones del peptidoglicano denominadas nanoporos (Nürnberg et al., 2014). Los mutantes de delección de AmiC1 y AmiC2 mostraron una reducción significativa en el número de nanoporos con un consiguiente transporte intercelular afectado, cambios en la morfología celular e

incapacidad para diferenciar heterocistos (Bornikoel et al., 2017). Dado que se encontraron menores niveles de estas proteínas en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* que en el de *Anabaena* sp. PCC7120, esto podría estar relacionado con algunas de las alteraciones en el fenotipo de EB2770FurC observadas en los Capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral, como la incapacidad para formar heterocistos en condiciones de deficiencia de nitrógeno o los cambios en la morfología celular. No obstante, en el futuro serán necesarios experimentos adicionales para discernir si FurC está implicada en la regulación directa de la expresión de *amiC1* y *amiC2* en *Anabaena* sp. PCC7120.

Así mismo, se detectó una disminución de la abundancia de otras proteínas esenciales para la biogénesis de la pared celular, como Omp85 (AlI2269). El mantenimiento y ensamblaje de la membrana externa depende de las proteínas de la familia Omp85, en *Anabaena* sp. PCC7120. Alr2269 es la proteína Omp85 más abundante y está presente tanto en células vegetativas como en heterocistos (Moslavac et al., 2005, Moslavac et al., 2007b). La delección de AlI2269 da lugar a una membrana externa con mayor permeabilidad y como consecuencia una mayor sensibilidad a sustancias nocivas, como la eritromicina (Nicolaisen et al., 2009). Por otra parte, las porinas tipo OprB; Alr0834, Alr4550 y AlI4499 también eran menos abundantes en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC*. La porina Alr0834, denominada OprB-1 se ha identificado tanto en células vegetativas como en heterocistos, pero su expresión aumenta durante la fase temprana de la diferenciación del heterocisto (Moslavac et al., 2005, Moslavac et al., 2007b). En el caso de las porinas Alr4550 y AlI4499 también se han encontrado en ambos tipos celulares (Moslavac et al., 2005, Moslavac et al., 2007b) y a pesar de que su expresión también se altera en respuesta a la deficiencia de nitrógeno (Ehira et al., 2003), se han descrito como unas de las proteínas más abundantes de la membrana externa (Moslavac et al., 2007b, Moslavac et al., 2005). Un estudio reciente ha descrito que en *Anabaena* sp. PCC7120, la expresión tanto de Omp85 como de las porinas OprB-I, Alr4550 y Alr4499 y AmiC2 está regulada por el RNA pequeño no codificante Yfr1, el cual reprime la expresión de todas ellas a excepción de AmiC2 que la aumenta (Brenes-Álvarez et al., 2020). Cabe mencionar que al igual que para el mutante de delección de *alr4550*, el mutante de delección de Yfr1 también mostró, junto con otras alteraciones, importantes defectos en la integridad y permeabilidad de la membrana de *Anabaena* sp. PCC7120 (Brenes-Álvarez et al., 2020). Dado que la sobreexpresión de *furC* provocó la disminución de los niveles de estas proteínas en el exoproteoma, se podría sugerir que la estirpe de sobreexpresión de *furC* muy probablemente presente alteraciones en la integridad de su membrana que pudieran afectar a la permeabilidad de esta y por consiguiente también a la composición del medio extracelular. Esta hipótesis podría explicar las diferencias encontradas

en el perfil del exometaboloma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120. Como ya se comentó en resultados, el exometaboloma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* presento una alta cantidad de los metabolitos anhidroMurNAc y GlcNAc-anhidroMurNAc. Estas moléculas se consideran precursoras de la capa de peptidoglicano, formada principalmente por la N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y el Ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y son de gran importancia por su potencial uso para la síntesis *in vitro* de muropéptidos, moléculas con una importante aplicación en la terapia contra el cáncer y desórdenes inmunológicos, entre otros usos (Ogawa et al., 2011, Griffin et al., 2019). Su síntesis *de novo* resulta muy costosa, por lo que adquirirlos haciendo uso del medio extracelular de cultivos de EB2770FurC podría suponer un gran avance para su obtención.

# Conclusiones



## 6. Conclusiones

1. La purificación de FurC recombinante de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante cromatografías de heparina y DEAE, en presencia de 10 mM de EDTA durante la primera etapa cromatográfica, proporciona una preparación de proteína activa con una pureza superior al 85 %.
2. La proteína FurC purificada presenta en su estructura un átomo de Zn fuertemente unido por subunidad de proteína y es capaz de interactuar con un segundo átomo de metal ( $Mn^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ ) el cual es necesario para unión del regulador a sus promotores diana. Los modelos realizados sugieren la implicación de los residuos Cys103, Asp105, His144 y Asp147 en la coordinación del átomo de zinc fuertemente unido y de los residuos His45, His98, His100, Asp111 y Asn93/Asp96 en la coordinación del metal regulador.
3. FurC experimenta dos procesos diferentes de inactivación dependientes de oxidación. Por una parte, se produce la clásica oxidación catalizada por metal, con la incorporación de un átomo de oxígeno que tiene lugar cuando se lleva a cabo la incubación de la proteína con  $Fe^{2+}$  en condiciones aerobias. Además, FurC se puede inactivar de forma reversible mediante la formación de puentes disulfuro entre dímeros en respuesta a condiciones oxidantes. Los modelos realizados muestran la implicación de la Cys86 en la formación de puentes disulfuro entre dímeros de FurC. Este tipo de oxidación reversible es la primera vez que se describe en una proteína PerR.
4. La sobreexpresión de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120 provoca alteraciones fenotípicas tales como una mayor tasa de crecimiento, diferencias en la morfología celular y en la composición en pigmentos, una menor eficiencia fotosintética, mayor tasa de respiración y menor tolerancia al estrés oxidativo.
5. FurC se podría considerar un regulador global en *Anabaena* sp. PCC7120. El análisis transcripcional y del fenotipo de la variante de sobreexpresión en diferentes condiciones y la identificación de nuevas dianas de FurC demuestran su participación en la regulación directa de genes relacionados con la respuesta a estrés por peróxido, la fotosíntesis, el metabolismo nitrogenado (incluyendo la formación de heterocistos), la homeostasis del hierro y el metabolismo energético, así como de otros reguladores todavía por caracterizar.
6. FurC juega un papel clave en la regulación de genes implicados en el proceso de diferenciación de heterocisto y la fijación del nitrógeno. En este trabajo se han identificado un total de 11 nuevas dianas de FurC relacionadas con este proceso. Entre las más relevantes figuran el regulador de la diferenciación del heterocisto *hetR*, los reguladores transcripcionales *hetZ*, y *asr1734*, las proteínas implicadas en la formación de la envuelta del heterocisto, de la capa HEP (*hepC*) y de la capa HGL (*hgdC*), la nitrogenasa reductasa *nifH* y su copia *nifH2*. De hecho, como consecuencia de esta

desregulación se observó que a nivel fenotípico la estirpe de sobreexpresión de *furC* no era capaz de diferenciar heterocistos.

7. Los análisis *in silico* de varios promotores diana permitieron definir una potencial secuencia consenso de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 de 19 pb. La búsqueda mediante análisis informáticos de nuevos sitios de unión de FurC en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 permitió inferir 18 nuevas dianas de FurC. Entre ellas importantes dianas implicadas en la regulación de genes relacionados con el metabolismo del carbono, como el regulador transcripcional de respuesta a limitación de CO<sub>2</sub>, CmpR, la glucógeno fosforilasa, GlgP1 y la enzima OpcA, requerida para la actividad de la G6PDH del ciclo de las pentosas fosfato.
8. FurC es capaz de interactuar con 2-OG en presencia de Mn<sup>2+</sup> y DTT. La interacción aumenta la capacidad de unión de FurC a algunos de los promotores de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno como por ejemplo *hetZ*, *hepC* y *hgdC*.
9. La sobreexpresión de *furC* en *Anabaena* sp. PCC7120 genera cambios en la abundancia de 213 proteínas en el exoproteoma. Entre ellas, se encuentra TrxA y varias proteínas predichas como potenciales “partners” de interacción. Además, se encuentran en menor abundancia un grupo de proteínas involucradas en la biogénesis de la pared celular, el transporte a través de membrana y la composición del peptidoglicano.
10. Los análisis comparativos del exometaboloma de *Anabaena* sp. PCC7120 y la variante de sobreexpresión de *furC* revelaron que esta última acumula en el medio extracelular de cultivo una gran cantidad de anhydroMurNAc y GlcNAc-anhydroMurNAc en comparación con la estirpe silvestre. Estos muropéptidos son precursores de la capa de peptidoglicano y considerados metabolitos de alto valor para la industria farmacéutica.

# Conclusions



## 7. Conclusions

1. Purification of recombinant FurC from *Anabaena* sp. PCC7120 by heparin and DEAE chromatographies, in presence of 10 mM EDTA during the first chromatographic step, provides a protein preparation with more than 85% purity and DNA-binding activity.
2. Purified FurC protein holds a strongly bound Zn atom per protein subunit and is capable of interacting with a second metal ion ( $Mn^{2+}$  or  $Zn^{2+}$ ) which is required for DNA-binding. The models of the FurC structure suggest the involvement of residues Cys103, Asp105, His144 and Asp147 in the coordination of the tightly bound zinc atom and of residues His45, His98, His100, Asp111 and Asn93/Asp96 in the coordination of the regulatory metal.
3. FurC is able to undergo two different inactivation processes based on protein oxidation. On the one hand, the irreversible classic metal-catalyzed oxidation, with the incorporation of an oxygen atom mediated by the incubation of the protein with  $Fe^{2+}$  under aerobic conditions. On the other hand, FurC can be reversibly inactivated by the formation of disulfide bridges between dimers in response to oxidative conditions. The structural models show the involvement of Cys86 in the formation of disulfide bridges between FurC dimers. This is the first time that this type of reversible oxidation has been described in a PerR protein.
4. Overexpression of *furC* in *Anabaena* sp. PCC7120 causes phenotypic alterations such as higher growth rate, differences in cell morphology and pigment composition, lower photosynthetic efficiency, higher respiration rate and lower tolerance to oxidative stress.
5. FurC is a global regulator in *Anabaena* sp. PCC7120. The transcriptional and phenotypic analysis of the *furC*-overexpressing variant under different conditions and the identification of new FurC targets unveil its participation in the direct regulation of genes related to the response to peroxide stress, photosynthesis, nitrogen metabolism (including the formation of heterocysts), iron homeostasis and energy metabolism, as well as other uncharacterized regulators.
6. FurC plays a key role in the regulation of genes involved in the process of heterocyst differentiation and nitrogen fixation. In this work, a total of 11 new FurC direct targets related to this process have been identified. Among the most relevant, the heterocyst differentiation regulator *hetR*, the transcriptional regulators *hetZ*, and *asr1734*, the genes involved in the formation of the heterocyst envelope, the HEP layer (*hepC*) and the HGL layer (*hgdC*), nitrogenase reductase *nifH* and its copy *nifH2*. As a consequence of this deregulation EB2770FurC is unable to differentiate heterocysts.

7. *In silico* analyses of several target promoters allowed the definition of putative a 19 bp-FurC consensus sequence from *Anabaena* sp. PCC7120. The bioinformatic screening of novel FurC binding sites in the *Anabaena* sp. PCC7120 genome led to the description of 18 new FurC targets. Among them, there are important targets involved in the regulation of genes related to carbon metabolism, such as the transcriptional regulator of response to CO<sub>2</sub> limitation, CmpR, glycogen phosphorylase, GlgP1 and the protein OpcA, required for the activity of the enzyme G6PDH of the pentose phosphate pathway.
8. FurC is able to interact with 2-OG in the presence of Mn<sup>2+</sup> and DTT. This interaction enhances the binding of FurC to the promoters of the genes related to nitrogen metabolism such as *hetZ*, *hepC* and *hgdC*.
9. Overexpression of *furC* from *Anabaena* sp. PCC7120 produces changes in the abundance of 213 proteins in its exoproteome. Among them, TrxA and several proteins predicted as potential interaction partners were identified. In addition, a group of proteins involved in cell wall biogenesis, membrane transport, and peptidoglycan composition are found in lower abundance.
10. Comparative analyses of the exometabolome of *Anabaena* sp. PCC7120 and the *furC*-overexpressing variant revealed that the latter accumulates a large amount of anhydroMurNAc and GlcNAc-anhydroMurNAc in the extracellular milieu compared to the wild type. These muropeptides are precursors of the peptidoglycan layer and are considered high value metabolites for the pharmaceutical industry.

# Bibliografía



## 8. Bibliografía

- Adams, D. G.** (2000). Symbiotic interactions. *En: Whitton B. A. y Potts M. (eds.) The ecology of cyanobacteria, their diversity in time and space.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 523-561.
- Adams, D. G. y Duggan, P. S.** (1999). Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.*, **144**, 3-33.
- Ahn, B. E. y Baker, T. A.** (2016). Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, PerR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, E23-31.
- Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L. y Aro, E. M.** (2011). Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **286**, 24007-24014.
- Álvarez-Escribano, I., Brenes-Álvarez, M., Olmedo-Verd, E., Vioque, A. y Muro-Pastor, A. M.** (2020). The Nitrogen Stress-Repressed sRNA NsrR1 Regulates Expression of *all1871*, a Gene Required for Diazotrophic Growth in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Life (Basel)*, **10**, 54.
- Álvarez-Escribano, I., Vioque, A. y Muro-Pastor, A. M.** (2018). NsrR1, a Nitrogen Stress-Repressed sRNA, Contributes to the Regulation of *nblA* in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Front Microbiol*, **9**, 2267.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. y Rodríguez-Quiñones, F.** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 215–237.
- Apte S.K., R., P., y Stewart, W.D.P.** (1978). Electron donation to ferredoxin in heterocysts of the N<sub>2</sub>-fixing alga *Anabaena cylindrica*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **200**, 1-25
- Aráoz, R., Molgó, J. y Tandeau De Marsac, N.** (2010). Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, **56**, 813-828.
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J. A., Clair, G., Malard, V. y Duport, C.** (2012). Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Rev Proteomics*, **9**, 561-575.
- Aro, E. M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N. y Rintamäki, E.** (2005). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.*, **56**, 347-356.
- Awai, K., Lechno-Yossef, S. y Wolk, C. P.** (2009). Heterocyst Envelope Glycolipids. *En: Wada, H. & Murata, N. (eds.) Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions.* Dordrecht: Springer Netherlands.
- Babele, P. K., Singh, G., Kumar, A. y Tyagi, M. B.** (2015). Induction and differential expression of certain novel proteins in *Anabaena* L31 under UV-B radiation stress. *Front Microbiol*, **6**, e0151384.
- Bagg, A. y Neilands, J. B.** (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochem*, **26**, 5471-5477.
- Bailey, S. y Grossman, A.** (2008). Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1410-1420.
- Banerjee, M., Ballal, A. y Apte, S. K.** (2012a). Mn-catalase (Alr0998) protects the photosynthetic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 from oxidative stress. *Environ. Microbiol.*, **14**, 2891-2900.

- Banerjee, M., Ballal, A. y Apte, S. K.** (2012b). A novel glutaredoxin domain-containing peroxiredoxin 'All1541' protects the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 from oxidative stress. *Biochem. J.*, **442**, 671-680.
- Banerjee, M., Raghavan, P. S., Ballal, A., Rajaram, H. y Apte, S. K.** (2013). Oxidative stress management in the filamentous, heterocystous, diazotrophic cyanobacterium, *Anabaena* PCC7120. *Photosynth Res.* **118**, 59–70
- Baniulis, D., Yamashita, E. y Zhang, H.** (2008). Structure–function of the cytochrome b6f complex. *Photochem. Photobiol.*, **84**.
- Bastet, L., Boileau, C., Bedu, S., Janicki, A., Latifi, A. y Zhang, C. C.** (2010). NtcA regulates *patA* expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **192**, 5257-5259.
- Becker, S., Frankel, M. B., Schneewind, O. y Missiakas, D.** (2014). Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 1574-1579.
- Beers, R. F. y Sizer, I. W.** (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
- Behrenfeld, M. J. y Kolber, Z. S.** (1999). Widespread iron limitation of phytoplankton in the South Pacific Ocean. *Science*, **283**.
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D., Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L. y Beukes, N. J.** (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, **427**, 117-120.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A. y Brunak, S.** (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.*, **5**, 58.
- Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. y Stal, L. J.** (1997). N<sub>2</sub> Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **19**, 139-185.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E.** (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242.
- Bes, M. T., Hernandez, J. A., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2001). Cloning, overexpression and interaction of recombinant Fur from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 with *isiB* and its own promoter. *FEMS Microbiol. Lett.*, **194**, 187-192.
- Black, T. A., Cai, Y. y Wolk, C. P.** (1993). Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.*, **9**, 77-84.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K. V.** (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.*, **91**, 179-194.
- Boehm, M., Yu, J., Krynicka, V., Barker, M., Tichy, M., Komenda, J., Nixon, P. J. y Nield, J.** (2012). Subunit organization of a *Synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *Plant Cell*, **24**, 3669-3683.
- Bornikoel, J., Carrión, A., Fan, Q., Flores, E., Forchhammer, K., Mariscal, V., Mullineaux, C. W., Perez, R., Silber, N., Wolk, C. P. y Maldener, I.** (2017). Role of Two Cell Wall Amidases in Septal Junction and Nanopore Formation in the Multicellular Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Front Cell Infect Microbiol*, **7**, 386.
- Borthakur, P. B., Orozco, C. C., Young-Robbins, S. S., Haselkorn, R. y Callahan, S. M.** (2005). Inactivation of *patS* and *hetN* causes lethal levels of heterocyst differentiation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.*, **57**, 111-123.
- Boyer, G. L., Gillam, A. H. y Trick, C.** (1987). Iron chelation and uptake. *En: Fay, P. y Baalen, C.* (eds.) *The cyanobacteria*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.

- Brenes-Álvarez, M., Olmedo-Verd, E., Vioque, A. y Muro-Pastor, A. M.** (2021). A nitrogen stress-inducible small RNA regulates CO<sub>2</sub> fixation in *Nostoc*. *Plant Physiol.*, **187**, 787-798.
- Brenes-Álvarez, M., Vioque, A. y Muro-Pastor, A. M.** (2020). The Integrity of the Cell Wall and Its Remodeling during Heterocyst Differentiation Are Regulated by Phylogenetically Conserved Small RNA Yfr1 in *Nostoc* sp. Strain PCC 7120. *mBio*, **11**.
- Brenot, A., King, K. Y. y Caparon, M. G.** (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.*, **55**, 221-234.
- Brown, D. G. y Freemont, P. S.** (1996). Crystallography in the Study of Protein-DNA Interactions. *En: Jones, C., Mulloy, B. y Sanderson, M. R. (eds.) Crystallographic Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Bsat, N. y Helmann, J. D.** (1999). Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.*, **181**, 4299-4307.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. y Helmann, J. D.** (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.*, **29**, 189-198.
- Buick, R.** (1992). The Antiquity of Oxygenic Photosynthesis: Evidence from Stromatolites in Sulphate-Deficient Archaean Lakes. *Science*, **255**, 74-77.
- Buikema, W. J. y Haselkorn, R.** (1991). Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes Dev.*, **5**, 321-330.
- Burnap, R. L., Hagemann, M. y Kaplan, A.** (2015). Regulation of CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Life*, **5**, 348-371.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. y Madden, T. L.** (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, **10**, 421.
- Cardona, T.** (2018). Early Archean origin of heterodimeric Photosystem I. *Heliyon*, **4**, e00548.
- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A. W. y Larkum, A. W.** (2019). Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology*, **17**, 127-150.
- Cassier-Chauvat, C. y Chauvat, F.** (2018). Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research. *eLS*.
- Caux-Thang, C., Parent, A., Sethu, R., Maiga, A., Blondin, G., Latour, J. M. y Duarte, V.** (2015). Single asparagine to arginine mutation allows PerR to switch from PerR box to fur box. *ACS Chem Biol*, **10**, 682-686.
- Cha, M. K., Hong, S. K. y Kim, I. H.** (2007). Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena* sp. PCC7120. *Free Radic Biol Med*, **42**, 1736-1748.
- Chandrangsu, P. y Helmann, J. D.** (2016). Intracellular Zn(II) Intoxication Leads to Dysregulation of the PerR Regulon Resulting in Heme Toxicity in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.*, **12**, e1006515.
- Chen, L. y Helmann, J. D.** (1995). *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol. Microbiol.*, **18**, 295-300.
- Chen, L., Keramati, L. y Helmann, J. D.** (1995). Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8190-8194.

- Chiancone, E. y Ceci, P.** (2010). The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 798-805.
- Chittora, D., Meena, M., Barupal, T. y Swapnil, P.** (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochemistry and biophysics reports*, **22**, 100737-100737.
- Christie-Oleza, J. A., Armengaud, J., Guerin, P. y Scanlan, D. J.** (2015). Functional distinctness in the exoproteomes of marine *Synechococcus*. *Environ. Microbiol.*, **17**, 3781-3794.
- Collet, J. F., D'souza, J. C., Jakob, U. y Bardwell, J. C.** (2003). Thioredoxin 2, an oxidative stress-induced protein, contains a high affinity zinc binding site. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45325-32.
- Corrales-Guerrero, L., Camargo, S., Valladares, A., Picossi, S., Luque, I., Ochoa De Alda, J. a. G. y Herrero, A.** (2018). FtsZ of Filamentous, Heterocyst-Forming Cyanobacteria Has a Conserved N-Terminal Peptide Required for Normal FtsZ Polymerization and Cell Division. *Front in Microbiol*, **9**.
- Cui, H., Wang, Y., Wang, Y. y Qin, S.** (2012). Genome-wide analysis of putative peroxiredoxin in unicellular and filamentous cyanobacteria. *BMC Evol. Biol.*, **12**, 220.
- Cui, X. y Churchill, G. A.** (2003). Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol*, **4**, 210.
- D'autréaux, B., Pecqueur, L., Gonzalez De Peredo, A., Diederix, R. E., Caux-Thang, C., Tabet, L., Bersch, B., Forest, E. y Michaud-Soret, I.** (2007). Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochem*, **46**, 1329-42.
- Daley, S. M., Kappell, A. D., Carrick, M. J. y Burnap, R. L.** (2012). Regulation of the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP<sup>+</sup> and alpha-ketogutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One*, **7**, e41286.
- Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A. y Marie, B.** (2019). Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. *Mar. Drugs*, **17**.
- Deruyter, Y. S. y Fromme, P.** (2008). Molecular structure of the photosynthetic apparatus. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution, 217-269.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R. y Henderson, I. R.** (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.*, **17**, 139-145.
- Diner, B. A. y Rappaport, F.** (2002). Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 551-80.
- Donze, M., Haveman, J. y Schiereck, P.** (1972). Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochim Biophys Acta*, **256**, 157-61.
- Douglas, A. E.** (2020). The microbial exometabolome: ecological resource and architect of microbial communities. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **375**, 20190250.
- Dubbs, J. M. y Mongkolsuk, S.** (2012). Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J. Bacteriol.*, **194**, 5495-5503.
- Ebner, P., Rinker, J. y Götz, F.** (2016). Excretion of cytoplasmic proteins in *Staphylococcus* is most likely not due to cell lysis. *Curr. Genet.*, **62**, 19-23.

- Ehira, S. y Ohmori, M.** (2006a). NrrA directly regulates expression of hetR during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **188**, 8520-8525.
- Ehira, S. y Ohmori, M.** (2006b). NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.*, **59**, 1692-1703.
- Ehira, S. y Ohmori, M.** (2011). NrrA, a nitrogen-regulated response regulator protein, controls glycogen catabolism in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38109-38114.
- Ehira, S., Ohmori, M. y Sato, N.** (2003). Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.*, **10**, 97-113.
- Ermakova, M., Battchikova, N., Allahverdiyeva, Y. y Aro, E. M.** (2013). Novel heterocyst-specific flavodiiron proteins in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.*, **587**, 82-7.
- Ernst, A., Reich, S. y Boger, P.** (1990). Modification of dinitrogenase reductase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* due to C starvation and ammonia. *J. Bacteriol.*, **172**, 748-755.
- Espinosa, J., Forchhammer, K., Burillo, S. y Contreras, A.** (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol. Microbiol.*, **61**, 457-469.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Milligan, A. J., Fennel, K., Cramer, B. S., Aubry, M. P., Berner, R. A., Novacek, M. J. y Zapol, W. M.** (2005). The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science*, **309**, 2202-2204.
- Faulkner, M. J., Ma, Z., Fuangthong, M. y Helmann, J. D.** (2012). Derepression of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide stress response leads to iron deficiency. *J. Bacteriol.*, **194**, 1226-1235.
- Fay, P.** (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev*, **56**, 340-373.
- Feldmann, E. A., Ni, S., Sahu, I. D., Mishler, C. H., Risser, D. D., Murakami, J. L., Tom, S. K., Mccarrick, R. M., Lorigan, G. A., Tolbert, B. S., Callahan, S. M. y Kennedy, M. A.** (2011). Evidence for direct binding between HetR from *Anabaena* sp. PCC 7120 and PatS-5. *Biochem*, **50**, 9212-24.
- Ferrão-Filho, A. D. S. y Kozlowsky-Suzuki, B.** (2011). Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs*, **9**, 2729-2772.
- Ferreira, F. y Straus, N. A.** (1994). Iron deprivation in cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.*, **6**.
- Fillat, M. F.** (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*, **546**, 41-52.
- Flaherty, B. L., Van Nieuwerburgh, F., Head, S. R. y Golden, J. W.** (2011). Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. *BMC Genomics*, **12**, 332.
- Flores, E. y Herrero, A.** (1994). Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation. *En: Bryant D. A. (ed), The molecular biology of cyanobacteria.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 487-517.

- Flores, E. y Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 39-50.
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C. P. y Maldener, I. (2006). Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends Microbiol.*, **14**, 439-443.
- Flores, E., Picossi, S., Valladares, A. y Herrero, A. (2019). Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, **1862**, 673-684.
- Forcada-Nadal, A., Llácer, J. L., Contreras, A., Marco-Marín, C. y Rubio, V. (2018). The PII-NAGK-PipX-NtcA Regulatory Axis of Cyanobacteria: A Tale of Changing Partners, Allosteric Effectors and Non-covalent Interactions. *Front Mol Biosci*, **5**, 91.
- Forchhammer, K. y Lüddecke, J. (2016). Sensory properties of the PII signalling protein family. *The FEBS Journal*, **283**, 425-437.
- Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N. y Helmann, J. D. (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.*, **184**, 3276-3286.
- Gaballa, A. y Helmann, J. D. (1998). Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **180**, 5815-21.
- Gaballa, A. y Helmann, J. D. (2002). A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **45**, 997-1005.
- Gao, H., Zhou, D., Li, Y., Guo, Z., Han, Y., Song, Y., Zhai, J., Du, Z., Wang, X., Lu, J. y Yang, R. (2008). The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.*, **190**, 3063-3075.
- Gao, L., Huang, X., Ge, H., Zhang, Y., Kang, Y., Fang, L., Liu, K. y Wang, Y. (2014) Profiling and compositional analysis of the exoproteome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *JMetabol Sys Biol*, **1**.
- Ghassemian, M. y Straus, N. A. (1996). Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology*, **142**.
- Giner-Lamia, J., Pereira, S. B., Bovea-Marco, M., Futschik, M. E., Tamagnini, P. y Oliveira, P. (2016). Extracellular Proteins: Novel Key Components of Metal Resistance in Cyanobacteria? *Front Microbiol*, **7**.
- Giordano, M., Beardall, J. y Raven, J. A. (2005). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **56**, 99-131.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J. y Pace, N. R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.*, **170**, 3584-3592.
- Golden, J. W. y Yoon, H. S. (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 557-563.
- Gong, Y. y Xu, X. (2012). A small internal antisense RNA (*aftsH*) of *all3642* (*ftsH*) in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Chin. Sci. Bull.*, **57**, 756-761.
- Gonzalez, A., Bes, M. T., Barja, F., Peleato, M. L. y Fillat, M. F. (2010). Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1900-1914.

- Gonzalez, A., Bes, M. T. y Peleato, M. L.** (2011). Unraveling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, **74**.
- Gonzalez, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2016). Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. *PLoS One*, **11**, e0151384.
- González, A., Fillat, M., Bes, M.-T., Peleato, M. y Sevilla, E.** (2018). The Challenge of Iron Stress in Cyanobacteria. *En: Tiwari, A. (ed.) Cyanobacteria*. Intechopen
- Gonzalez, A., Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2016b). Pivotal Role of Iron in the Regulation of Cyanobacterial Electron Transport. *Adv. Microb. Physiol.*, **68**, 169-217.
- Gonzalez, A., Valladares, A., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2013). FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.*, **587**, 2682-2690.
- Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. y Rensing, C.** (2002). ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 864-866.
- Griffin, M. E., Hespren, C. W., Wang, Y.-C. y Hang, H. C.** (2019). Translation of peptidoglycan metabolites into immunotherapeutics. *Clin Transl Immunology*, **8**, e1095.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. y Collier, J. L.** (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev*, **57**, 725-749.
- Guan, G., Pinochet-Barros, A., Gaballa, A., Patel, S. J., Arguello, J. M. y Helmann, J. D.** (2015). PfeT, a P1B4 -type ATPase, effluxes ferrous iron and protects *Bacillus subtilis* against iron intoxication. *Mol. Microbiol.*, **98**, 787-803.
- Guío, J., Bes, M. T., Balsera, M., Calvo-Begueria, L., Sevilla, E., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2021). Thioredoxin Dependent Changes in the Redox States of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Antioxidants*, **10**, 913.
- Guio, J., Sarasa-Buisan, C., Velazquez-Campoy, A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Peleato, M. L. y Sevilla, E.** (2020). 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.*, **594**, 278-289.
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L. y Noble, W.** (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, **8**, R24.
- Hagen, K. D. y Meeks, J. C.** (1999). Biochemical and genetic evidence for participation of DevR in a phosphorelay signal transduction pathway essential for heterocyst maturation in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *J. Bacteriol.*, **181**, 4430-4434.
- Hahn, A., Stevanovic, M., Brouwer, E., Bublak, D., Tripp, J., Schorge, T., Karas, M. y Schleiff, E.** (2015). Secretome analysis of *Anabaena* sp. PCC 7120 and the involvement of the TolC-homologue HgdD in protein secretion. *Environ. Microbiol.*, **17**, 767-780.
- Hahn, A., Stevanovic, M., Mirus, O. y Schleiff, E.** (2012). The TolC-like protein HgdD of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is involved in secondary metabolite export and antibiotic resistance. *J. Biol. Chem*, **287**, 41126-41138.
- Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., Chater, K. F., Cho, Y.-H. y Roe, J.-H.** (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive Fur-like Repressor CatR Regulating the Major Catalase Gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 38254-38260.
- Hantke, K.** (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 172-177.
- Harder, J. y Schröder, J.-M.** (2002). RNase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46779-46784.

- Haselkorn, R.** (1986). Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 525-547.
- Hayashi, K., Ohsawa, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N. y Ogura, M.** (2005). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **187**, 6659-6667.
- Hayes, J.** (1983). Geochemical evidence bearing on the origin of aerobiosis, a speculative hypothesis. En: Schopf J. W (ed.) *Earth's Earliest Biosphere*. Princeton University Press., 291-301.
- Herbig, A. F. y Helmann, J. D.** (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.*, **41**, 849-59.
- Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Neira, J. L. y Peleato, M. L.** (2002). Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem. J.*, **366**, 315-22.
- Hernandez, J. A., Curatti, L., Aznar, C. P., Perova, Z., Britt, R. D. y Rubio, L. M.** (2008). Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11679 - 11684.
- Hernandez, J. A., Lopez-Gomollon, S., Bes, M. T., Fillat, M. F. y Peleato, M. L.** (2004a). Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol. Lett.*, **236**, 275-82.
- Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2006). Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: A Reducing Environment and the Presence of Mn<sup>2+</sup> are Positive Effectors in the Binding to *isiB* and *furA* Promoters. *BioMetals*, **19**, 259-268.
- Hernandez, J. A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2006). Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Mol. Biol.*, **355**, 325-334.
- Hernandez, J. A., Peleato, M. L., Fillat, M. F. y Bes, M. T.** (2004b). Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.*, **577**, 35-41.
- Herrero, A. y Flores, E.** (2019). Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena*. *Environ. Microbiol.*, **21**, 1-17.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. y Flores, E.** (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, **183**, 411-425.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., Valladares, A. y Flores, E.** (2004). Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 469-487.
- Herrero, A., Picossi S., and Flores, E.** (2013). Gene expression during heterocyst differentiation. *Adv. Bot. Res.*, **65**, 281-329.
- Herrero, A., Stavans, J. y Flores, E.** (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 831-854.
- Higa, K. C. y Callahan, S. M.** (2010). Ectopic expression of *hetP* can partially bypass the need for *hetR* in heterocyst differentiation by *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.*, **77**, 562-574.

- Higo, A., Nishiyama, E., Nakamura, K., Hihara, Y. y Ehira, S. (2019). *cyAbrB* Transcriptional Regulators as Safety Devices To Inhibit Heterocyst Differentiation in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **201**, e00244-19
- Higo, A., Suzuki, T., Ikeuchi, M. y Ohmori, M. (2007). Dynamic transcriptional changes in response to rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*, **153**, 3685-3694.
- Hillmann, F., Fischer, R. J., Saint-Prix, F., Girbal, L. y Bahl, H. (2008). PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol. Microbiol.*, **68**, 848-60.
- Hoiczky, E. y Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.*, **182**, 1191-1199.
- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. y Foster, S. J. (2001a). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **69**, 3744-3754.
- Horsburgh, M. J., Ingham, E. y Foster, S. J. (2001b). In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.*, **183**, 468-475.
- Huang, T. C., Lin, R. F., Chu, M. K. y Chen, H. M. (1999). Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. *Microbiology*, **145** ( Pt 3), 743-753.
- Huang, X., Dong, Y. y Zhao, J. (2004). HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4848-4853.
- Huergo, L. F. y Dixon, R. (2015). The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **79**, 419-435.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 755-76.
- Ito, K. y Akiyama, Y. (2005). Cellular Functions, Mechanism of Action, and Regulation of FtsH Protease. *Annu. Rev. Microbiol.*, **59**, 211-231.
- Jacquamet, L., Traore, D. A., Ferrer, J. L., Proux, O., Testemale, D., Hazemann, J. L., Nazarenko, E., El Ghazouani, A., Caux-Thang, C., Duarte, V. y Latour, J. M. (2009). Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding. *Mol. Microbiol.*, **73**, 20-31.
- Jansen, T., Kidron, H., Taipaleenmaki, H., Salminen, T. y Maenpaa, P. (2005). Transcriptional profiles and structural models of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 Deg proteases. *Photosynth Res*, **84**, 57-63.
- Ji, C. J., Kim, J. H., Won, Y. B., Lee, Y. E., Choi, T. W., Ju, S. Y., Youn, H., Helmann, J. D. y Lee, J. W. (2015). *Staphylococcus aureus* PerR Is a Hypersensitive Hydrogen Peroxide Sensor using Iron-mediated Histidine Oxidation. *J. Biol. Chem.*, **290**, 20374-20386.
- Jiang, Y. L., Wang, X. P., Sun, H., Han, S. J., Li, W. F., Cui, N., Lin, G. M., Zhang, J. Y., Cheng, W., Cao, D. D., Zhang, Z. Y., Zhang, C. C., Chen, Y. y Zhou, C. Z. (2018). Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, 403-408.
- Johnson, J. W., Fisher, J. F. y Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1277**, 54-75.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583-589.
- Kana, R., Prášil, O., Komárek, O., Papageorgiou, G. C. y Govindjee (2009). Spectral characteristic of fluorescence induction in a model cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (PCC 7942). *Biochim Biophys Acta*, **1787**, 1170-1178.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., et al Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, et al. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.*, **8**, 205-213; 227-253.
- Kaneko, T., Sato, S. y Kotani, H. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, **3**.
- Kaplan-Levy, R., Hadas, O., Summers, M., Rücker, J. y Sukenik, A. (2010). Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. En: Lubzens, E., Cerda, J., Clark, M. (eds.) *Dormancy and Resistance in Harsh Environments. Topics in Current Genetics*, **21**. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kaplan, A. y Reinhold, L. (1999). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 539-570.
- Kato, Y., Hyodo, K. y Sakamoto, W. (2018). The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiol.*, **178**, 596-611.
- Kato, Y. y Sakamoto, W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Frontiers in Plant Science*, **9**.
- Katoh, H. (2012). Desiccation-inducible genes are related to N(2)-fixing system under desiccation in a terrestrial cyanobacterium. *Biochim Biophys Acta*, **1817**, 1263-9.
- Kebouchi, M., Saul, F., Taher, R., Landier, A., Beaudeau, B., Dubrac, S., Weber, P., Haouz, A., Picardeau, M. y Benaroudj, N. (2018). Structure and function of the *Leptospira interrogans* peroxide stress regulator (PerR), an atypical PerR devoid of a structural metal-binding site. *J. Biol. Chem.*, **293**, 497-509.
- Kerfeld, C. A. y Melnicki, M. R. (2016). Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **31**, 66-75.
- Khudyakov, I., Gladkov, G. y Elhai, J. (2020). Inactivation of Three RG(S/T)GR Pentapeptide-Containing Negative Regulators of HetR Results in Lethal Differentiation of *Anabaena* PCC 7120. *Life (Basel)*, **10**.
- Kim, Y., Roe, J.-H., Park, J.-H., Cho, Y.-J. y Lee, K.-L. (2021). Regulation of iron homeostasis by peroxide-sensitive CatR, a Fur-family regulator in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Microbiology*, **59**, 1083-1091.
- King, K. Y., Horenstein, J. A. y Caparon, M. G. (2000). Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, **182**, 5290-5299.
- Kirilovsky, D., Kaňa, R., Prasil, O., Demmig-Adams, B., Garab, G. y Adams, W. I. (2014). Mechanisms Modulating Energy Arriving at Reaction Centers in Cyanobacteria. *Non-Photochemical Quenching Energy Dissipation Plants, Algae Cyanobacteria*, 471-501.
- Klähn, S., Schaal, C., Georg, J., Baumgartner, D., Knippen, G., Hagemann, M., Muro-Pastor, A. M. y Hess, W. R. (2015). The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in

- cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E6243-52.
- Knoll, A.** (2008). Cyanobacteria and Earth History. *En: Herrero, A. y Flores, E. (eds.) The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 1-19.
- Komenda, J., Barker, M., Kuviková, S., De Vries, R., Mullineaux, C. W., Tichy, M. y Nixon, P. J.** (2006). The FtsH protease *slr0228* is important for quality control of photosystem II in the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **281**, 1145-1151.
- Kranzler, C., Lis, H., Finkel, O. M., Schmetterer, G., Shaked, Y. y Keren, N.** (2014). Coordinated transporter activity shapes high-affinity iron acquisition in cyanobacteria. *The ISME Journal*, **8**, 409-417.
- Kranzler, C., Rudolf, M. y Keren, N.** (2013). Iron in cyanobacteria. *Adv. Bot. Res.*, **65**.
- Krissinel, E. y Henrick, K.** (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystallane state. *J Mol Biol* **372**, 774–797
- Kroth, P. G.** (2015). The biodiversity of carbon assimilation. *J. Plant Physiol.*, **172**, 76-81.
- Krynická, V., Tichý, M., Krafl, J., Yu, J., Kaňa, R., Boehm, M., Nixon, P. J. y Komenda, J.** (2014). Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.*, **94**, 609-624.
- Kumar, K., Ota, M., Taton, A. y Golden, J. W.** (2019). Excision of the 59-kb *fdxN* DNA element is required for transcription of the *nifD* gene in *Anabaena* PCC 7120 Heterocysts. *N. Z. J. Bot.*, **57**, 76-92.
- Kyle, D. J., Ohad, I. y Arntzen, C. J.** (1984). Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4070-4074.
- Ladbury, J. E. y Chowdhry, B. Z.** (1996). Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem. Biol.*, **3**, 791-801.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, L.-S., Chang, P.-C. y Chang, C.-T.** (2008). Isolation and Characterization of Superoxide Dismutase from Wheat Seedlings. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8121-8129.
- Latifi, A., Jeanjean, R., Lemeille, S., Havaux, M. y Zhang, C. C.** (2005). Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **187**, 6596-6598.
- Latifi, A., Ruiz, M. y Zhang, C. C.** (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 258-278.
- Lea-Smith, D. J., Bombelli, P., Vasudevan, R. y Howe, C. J.** (2016). Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 247-255.
- Ledala, N., Pearson, S. L., Wilkinson, B. J. y Jayaswal, R. K.** (2007). Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, **153**, 1103-1111.
- Lee, J.-W. y Helmann, J. D.** (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *BioMetals*, **20**, 485.

- Lee, J. W. y Helmann, J. D. (2006a). Biochemical characterization of the structural Zn<sup>2+</sup> site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR. *J. Biol. Chem.*, **281**, 23567-23578.
- Lee, J. W. y Helmann, J. D. (2006b). The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, **440**, 363-367.
- Lehner, J., Berendt, S., Dörsam, B., Pérez, R., Forchhammer, K. y Maldener, I. (2013). Prokaryotic multicellularity: a nanopore array for bacterial cell communication. *The FASEB Journal*, **27**, 2293-2300.
- Li, H., Singh, A. K. y McIntyre, L. M. (2004). Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.*, **186**.
- Li, T., Huang, X., Zhou, R., Liu, Y., Li, B., Nomura, C. y Zhao, J. (2002). Differential expression and localization of Mn and Fe superoxide dismutases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **184**, 5096-5103.
- Lin, P. C. y Pakrasi, H. B. (2019). Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta*, **249**, 145-154.
- Lindahl, M. y Kieselbach, T. (2009). Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *J. Proteom*, **72**, 416-438.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D. M., Prado, M., He, G., Gross, M. L. y Blankenship, R. E. (2013). Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science*, **342**, 1104-1107.
- Llácer, J. L., Espinosa, J., Castells, M. A., Contreras, A., Forchhammer, K. y Rubio, V. (2010). Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15397-15402.
- Lo, M., Murray, G. L., Khoo, C. A., Haake, D. A., Zuerner, R. L. y Adler, B. (2010). Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. *Infect. Immun.*, **78**, 4850-4859.
- Lopez-Gomollon, S., Hernandez, J. A., Pellicer, S., Angarica, V. E., Peleato, M. L. y Fillat, M. F. (2007). Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons. *J. Mol. Biol.*, **374**, 267-281.
- Lopez-Gomollon, S., Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F. (2009). New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J.*, **418**, 201-207.
- Lopez-Igual, R., Picossi, S., Lopez-Garrido, J., Flores, E. y Herrero, A. (2012). N and C control of ABC-type bicarbonate transporter Cmp and its LysR-type transcriptional regulator CmpR in a heterocyst-forming cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Environ. Microbiol.*, **14**, 1035-1048.
- Lopez-Igual, R., Wilson, A., Leverenz, R. L., Melnicki, M. R., Bourcier De Carbon, C., Sutter, M., Turmo, A., Perreau, F., Kerfeld, C. A. y Kirilovsky, D. (2016). Different Functions of the Paralogs to the N-Terminal Domain of the Orange Carotenoid Protein in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Physiol.*, **171**, 1852-1866.
- Magnuson, A. (2019). Heterocyst Thylakoid Bioenergetics. *Life (Basel)*, **9**.
- Makthal, N., Rastegari, S., Sanson, M., Ma, Z., Olsen, R. J., Helmann, J. D., Musser, J. M. y Kumaraswami, M. (2013). Crystal structure of peroxide stress regulator from

- Streptococcus pyogenes* provides functional insights into the mechanism of oxidative stress sensing. *J. Biol. Chem.*, **288**, 18311-18324.
- Mallén-Ponce, M. J., Huertas, M. J., Sánchez-Riego, A. M. y Florencio, F. J.** (2021). Depletion of m-type thioredoxin impairs photosynthesis, carbon fixation, and oxidative stress in cyanobacteria. *Plant Physiol.*, **187**, 1325-1340.
- Malnoë, A., Wang, F., Girard-Bascou, J., Wollman, F. A. y De Vitry, C.** (2014). Thylakoid FtsH protease contributes to photosystem II and cytochrome b6f remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *Plant Cell*, **26**, 373-90.
- Manganelli, M., Scardala, S., Stefanelli, M., Palazzo, F., Funari, E., Vichi, S. y Buratti, F.** (2012). Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, **48**, 415-428.
- Maqubela, M., Muchaonyerwa, P. y Mnkeni, P.** (2012). Inoculation effects of two South African cyanobacteria strains on aggregate stability of a silt loam soil. *African Journal of Biotechnology*, **11**, 10726-10735.
- Margulis, L.** (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- Mariscal, V., Herrero, A. y Flores, E.** (2007). Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol. Microbiol.*, **65**, 1139-1145.
- Martin-Luna, B., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F. y Peleato, M. L.** (2006). Identification of a Ferric uptake regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**, 63-70.
- Mata-Cabana, A., Florencio, F. J. y Lindahl, M.** (2007). Membrane proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 interacting with thioredoxin. *Proteomics*, **7**, 3953-3963.
- Mazur, B. J., Rice, D. y Haselkorn, R.** (1980). Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 186-190.
- Mckinney, R.** (1953). Staining bacterial polysaccharides. *J. Bacteriol.*, **66**, 453-454.
- Meeks, J. C. y Elhai, J.** (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **66**, 94-121.
- Meeks, J. C., Wolk, C. P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P. W. y Chien, W. S.** (1978). Pathways of assimilation of  $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$  and  $^{13}\text{NH}_4^+$  by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.*, **134**, 125-130.
- Meiss, G., Gimadutdinow, O., Haberland, B. y Pingoud, A.** (2000). Mechanism of DNA cleavage by the DNA/RNA-non-specific *Anabaena* sp. PCC 7120 endonuclease NucA and its inhibition by NuiA. *J. Mol. Biol.*, **297**, 521-34.
- Mihara, S., Sugiura, K., Yoshida, K. y Hisabori, T.** (2020). Thioredoxin targets are regulated in heterocysts of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 in a light-independent manner. *J. Exp. Bot.*, **71**, 2018-2027.
- Mihara, S., Wakao, H., Yoshida, K., Higo, A., Sugiura, K., Tsuchiya, A., Nomata, J., Wakabayashi, K. I. y Hisabori, T.** (2018). Thioredoxin regulates G6PDH activity by changing redox states of OpcA in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. J.*, **475**, 1091-1105.

- Misra, H. S. y Tuli, R. (2000). Differential Expression of Photosynthesis and Nitrogen Fixation Genes in the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol.*, **122**, 731-736.
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W. R. y Muro-Pastor, A. M. (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 20130-5.
- Mongkolsuk, S. y Helmann, J. D. (2002). Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.*, **45**, 9-15.
- Montgomery, B. L. (2015). Light-dependent governance of cell shape dimensions in cyanobacteria. *Front Microbiol*, **6**, 514.
- Montoya, J. P., Holl, C. M., Zehr, J. P., Hansen, A., Villareal, T. A. y Capone, D. G. (2004). High rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature*, **430**, 1027-32.
- Moreira, C., Vasconcelos, V. y Antunes, A. (2013). Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. *Mar. Drugs*, **11**, 4350-4369.
- Morikawa, K., Ohniwa, R. L., Kim, J., Maruyama, A., Ohta, T. y Takeyasu, K. (2006). Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes Cells*, **11**, 409-423.
- Moslavac, S., Bredemeier, R., Mirus, O., Granvogel, B., Eichacker, L. A. y Schleiff, E. (2005). Proteomic Analysis of the Outer Membrane of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Journal of Proteome Research*, **4**, 1330-1338.
- Moslavac, S., Nicolaisen, K., Mirus, O., Al Dehni, F., Pernil, R., Flores, E., Maldener, I. y Schleiff, E. (2007a). A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **189**, 7887-7895.
- Moslavac, S., Reisinger, V., Berg, M., Mirus, O., Vosyka, O., Plöschner, M., Flores, E., Eichacker, L. A. y Schleiff, E. (2007b). The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120. **388**, 823-829.
- Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. y Flores, E. (1997). The *nuiA* gene from *Anabaena* sp. encoding an inhibitor of the NucA sugar-non-specific nuclease. *J. Mol. Biol.*, **268**, 589-598.
- Muro-Pastor, A. M. y Hess, W. R. (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol.*, **20** **11**, 548-557.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., Flores, E. y Herrero, A. (1999). The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *J. Bacteriol.*, **181**, 6664-9.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38320-8.
- Napolitano, M., Rubio, M. A., Santamaria-Gomez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N. J. y Luque, I. (2012). Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **194**, 2426-2436.
- Narayan, O. P., Kumari, N. y Rai, L. C. (2011). Iron starvation-induced proteomic changes in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: exploring survival strategy. *J Microbiol Biotechnol*, **21**, 136-46.
- Nicolaisen, K., Hahn, A. y Valdebenito, M. (2010a). The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**.

- Nicolaisen, K., Hahn, A., Valdebenito, M., Moslavac, S., Samborski, A., Maldener, I., Wilken, C., Valladares, A., Flores, E., Hantke, K. y Schleiff, E. (2010b). The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochim Biophys Acta*, **1798**, 2131-2140.
- Nicolaisen, K., Mariscal, V., Bredemeier, R., Pernil, R., Moslavac, S., López-Igual, R., Maldener, I., Herrero, A., Schleiff, E. y Flores, E. (2009). The outer membrane of a heterocyst-forming cyanobacterium is a permeability barrier for uptake of metabolites that are exchanged between cells. *Mol. Microbiol.*, **74**, 58-70.
- Nies, D. H. (2012). Zinc starvation response in a cyanobacterium revealed. *J. Bacteriol.*, **194**, 2407-2412.
- Nishimura, T., Takahashi, Y., Yamaguchi, O., Suzuki, H., Maeda, S. y Omata, T. (2008). Mechanism of low CO<sub>2</sub>-induced activation of the *cmp* bicarbonate transporter operon by a LysR family protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Mol. Microbiol.*, **68**, 98-109.
- Niyogi, K. K. y Truong, T. B. (2013). Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**, 307-314.
- Nürnberg, D. J., Mariscal, V., Parker, J., Mastroianni, G., Flores, E. y Mullineaux, C. W. (2014). Branching and intercellular communication in the Section V cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, a complex multicellular prokaryote. *Mol. Microbiol.*, **91**, 935-949.
- Ochoa De Alda, J. a. G., Esteban, R., Diago, M. L. y Houmard, J. (2014). The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nature Communications*, **5**, 4937.
- Ogawa, C., Liu, Y.-J. y Kobayashi, K. S. (2011). Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr. Bioact. Compd*, **7**, 180-197.
- Ohad, I., Kyle, D. J. y Arntzen, C. J. (1984). Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.*, **99**, 481-485.
- Ohad, I., Prâail, O. y Adir, N. (1992) Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. En: Barber J. (ed.) *The Photosystems*. 295-348
- Ohnishi, N. (2017) Towards understandings the regulation of photosynthesis under natural environments: Analyses for the behavior of photoacclimation processes in the mutant strains of a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* under outdoor conditions. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **64**.
- Oliveira, P., Martins, N. M., Santos, M., Couto, N. A., Wright, P. C. y Tamagnini, P. (2015). The *Anabaena* sp. PCC 7120 Exoproteome: Taking a Peek outside the Box. *Life (Basel)*, **5**, 130-163.
- Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y. y Maeda, S.-I. (2001). Involvement of a CbbR Homolog in Low CO<sub>2</sub>-Induced Activation of the Bicarbonate Transporter Operon in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, **183**, 1891-1898.
- Orozco, C. C., Risser, D. D. y Callahan, S. M. (2006). Epistasis analysis of four genes from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 suggests a connection between PatA and PatS in heterocyst pattern formation. *J. Bacteriol.*, **188**, 1808-1816.

- Osteryoung, K. W., Stokes, K. D., Rutherford, S. M., Percival, A. L. y Lee, W. Y. (1998). Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial *ftsZ*. *Plant Cell*, **10**, 1991-2004.
- Palyada, K., Sun, Y. Q., Flint, A., Butcher, J., Naikare, H. y Stintzi, A. (2009). Characterization of the oxidative stress stimulon and PerR regulon of *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics*, **10**, 481.
- Pantelić, D., Svirčev, Z., Simeunović, J., Vidović, M. y Trajković, I. (2013). Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*, **91**, 421-441.
- Pascual, M. B., Mata-Cabana, A., Florencio, F. J., Lindahl, M. y Cejudo, F. J. (2011). A comparative analysis of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system from plants and cyanobacteria. *Plant Physiol.*, **155**, 1806-1816.
- Payankulam, S., Li, L. M. y Arnosti, D. N. (2010). Transcriptional repression: conserved and evolved features. *Curr. Biol.*, **20**, R764-71.
- Perard, J., Coves, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., Galop, S., Signor, L., Crouzy, S., Michaud-Soret, I. y De Rosny, E. (2016). Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry*, **55**, 1503-1515.
- Pereira, S. B., Sousa, A., Santos, M., Araújo, M., Serôdio, F., Granja, P. y Tamagnini, P. (2019). Strategies to Obtain Designer Polymers Based on Cyanobacterial Extracellular Polymeric Substances (EPS). *Int J Mol Sci*, **20**.
- Pinochet-Barros, A. y Helmann, J. D. (2018). Redox Sensing by Fe<sup>2+</sup> in Bacterial Fur Family Metalloregulators. *Antioxidants & redox signaling*, **29**, 1858-1871.
- Planavsky, N. J., Asael, D., Hofmann, A., Reinhard, C. T., Lalonde, S. V., Knudsen, A., Wang, X., Ossa Ossa, F., Pecoits, E., Smith, A. J. B., Beukes, N. J., Bekker, A., Johnson, T. M., Konhauser, K. O., Lyons, T. W. y Rouxel, O. J. (2014). Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. *Nature Geoscience*, **7**, 283-286.
- Poole, L. B., Karplus, P. A. y Claiborne, A. (2004). Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 325-347.
- Price, G. D., Badger, M. R., Woodger, F. J. y Long, B. M. (2008). Advances in understanding the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.*, **59**, 1441-1461.
- Qiu, G. W., Koedooder, C., Qiu, B. S., Shaked, Y. y Keren, N. (2022). Iron transport in cyanobacteria - from molecules to communities. *Trends Microbiol.*, **30**, 229-240.
- Rachedi, R., Foglino, M. y Latifi, A. (2020). Stress Signaling in Cyanobacteria: A Mechanistic Overview. *Life (Basel)*, **10**.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W. y Korb, R. E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynthesis Res.*, **60**.
- Razquin, P., Fillat, M. F., Schmitz, S., Stricker, O., Bohme, H., Gomez-Moreno, C. y Peleato, M. L. (1996). Expression of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in heterocysts from *Anabaena* sp. *Biochem. J.*, **316** ( Pt 1), 157-160.
- Rea, R., Hill, C. y Gahan, C. G. (2005). *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8314-8322.

- Rea, R. B., Gahan, C. G. y Hill, C. (2004). Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect. Immun.*, **72**, 717-727.
- Reade, J. P. H., Dougherty, L. J., Rogers, L. J. y Gallon, J. R. (1999). Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiology*, **145 ( Pt 7)**, 1749-1758.
- Ricci, S., Janulczyk, R. y Bjorck, L. (2002). The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.*, **70**, 4968-4976.
- Rice, D., Mazur, B. J. y Haselkorn, R. (1982). Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13157-13163.
- Richardson, D. J. (2000). Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. *Microbiology*, **146**.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. And Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**, 1-61.
- Roberts, I. N., Lam, X. T., Miranda, H., Kieselbach, T. y Funk, C. (2012). Degradation of PsbO by the Deg protease HhoA Is thioredoxin dependent. *PLoS One*, **7**, e45713.
- Roumezi, B., Xu, X., Risoul, V., Fan, Y., Lebrun, R. y Latifi, A. (2019). The Pkn22 Kinase of *Nostoc* PCC 7120 Is Required for Cell Differentiation via the Phosphorylation of HetR on a Residue Highly Conserved in Genomes of Heterocyst-Forming Cyanobacteria. *Front Microbiol*, **10**, 3140.
- Rubio, L. M. y Ludden, P. W. (2008). Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 93-111.
- Sánchez-Baracaldo, P. y Cardona, T. (2020). On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytol.*, **225**, 1440-1446.
- Sanchez-Baracaldo, P., Hayes, P. y Blank, C. (2005). Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3: 145-165. *Geobiology*, **3**, 145-165.
- Sarasa-Buisan, C., Guio, J., Broset, E., Peleato, M. L., Fillat, M. F. y Sevilla, E. (2022). FurC (PerR) from *Anabaena* sp. PCC7120: a versatile transcriptional regulator engaged in the regulatory network of heterocyst development and nitrogen fixation. *Environ. Microbiol*, **24**, 566-582
- Sarmah, P. y Rout, J. (2020). Chapter 22 - Role of algae and cyanobacteria in bioremediation: prospects in polyethylene biodegradation. *En: Singh, P. K., Kumar, A., Singh, V. K. & Shrivastava, A. K. (eds.) Advances in Cyanobacterial Biology*. Academic Press.
- Sarvan, S., Charih, F., Butcher, J., Brunzelle, J. S., Stintzi, A. y Couture, J. F. (2018). Crystal structure of *Campylobacter jejuni* peroxide regulator. *FEBS Lett.*, **592**, 2351-2360.
- Schirrmeister, B. E., Gugger, M. y Donoghue, P. C. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology*, **58**, 769-785.
- Schneider, D., Fuhrmann, E., Scholz, I., Hess, W. R. y Graumann, P. L. (2007). Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes. *BMC Cell Biol.*, **8**, 39.

- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M. y Dean, D. R.** (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 701-722.
- Sein-Echaluce, V. C., Gonzalez, A., Napolitano, M., Luque, I., Barja, F., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2014). Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ. Microbiol.*, Epub
- Sein-Echaluce, V. C., Gonzalez, A., Napolitano, M., Luque, I., Barja, F., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2015). Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ. Microbiol.*, **17**, 2006-2017.
- Sethu, R., Goure, E., Signor, L., Caux-Thang, C., Clemancey, M., Duarte, V. y Latour, J. M.** (2016). Reaction of PerR with Molecular Oxygen May Assist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Sensing in Anaerobes. *ACS Chem Biol*, **11**, 1438-44.
- Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2021). Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Arch Biochem Biophys*, **701**, 108770.
- Sevilla, E., Sarasa-Buisan, C., Gonzalez, A., Cases, R., Kufryk, G., Peleato, M. L. y Fillat, M. F.** (2019). Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell Physiol.*, **60**, 1778-1789.
- Shcolnick, S. y Keren, N.** (2006). Metal homeostasis in cyanobacteria and chloroplasts. Balancing benefits and risks to the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol.*, **141**.
- Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Marsac, N. T. D., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K. W., Han, C. S., Rubin, E. M., Eisen, J. A., Woyke, T., Gugger, M. y Kerfeld, C. A.** (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 1053-1058.
- Shrivastava, A. K., Chatterjee, A., Yadav, S., Singh, P. K., Singh, S. y Rai, L. C.** (2015). UV-B stress induced metabolic rearrangements explored with comparative proteomics in three *Anabaena* species. *J Proteomics*, **127**, 122-33.
- Shvarev, D., Nishi, C. N., Wormer, L. y Maldener, I.** (2018). The ABC Transporter Components HgdB and HgdC are Important for Glycolipid Layer Composition and Function of Heterocysts in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Life (Basel)*, **8**.
- Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C. W., Robinson, C., Mann, N. H. y Nixon, P. J.** (2003). FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell*, **15**, 2152-2164.
- Stadnichuk, I. N., Yanyushin, M. F., Bernát, G., Zlenko, D. V., Krasilnikov, P. M., Lukashev, E. P., Maksimov, E. G. y Paschenko, V. Z.** (2013). Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **125**, 137-145.
- Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire, G.** (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 225-74.
- Staron, P.** (2012). Structural and Functional Characterization of the ATP-Driven Glycolipid-Efflux Pump DevBCA-TolC and Its Homologues in the Filamentous Cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC7120, Eberhard-Karls Universität Tübingen: Tübingen, Germany (Tesis Doctoral)
- Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S. J. y Söding, J.** (2019). HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC Bioinformatics*, **20**, 473-473.

- Stevanovic, M., Hahn, A., Nicolaisen, K., Mirus, O. y Schleiff, E.** (2012). The components of the putative iron transport system in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ. Microbiol.*, **14**, 1655-1670.
- Stewart, W. D. P. y Codd, G. A.** (1975). Polyhedral bodies (carboxysomes) of nitrogen-fixing blue-green algae. *British Phycological Journal*, **10**, 273-278.
- Stoitchkova, K., Zsiros, O., Jávorfí, T., Páli, T., Andreeva, A., Gombos, Z. y Garab, G.** (2007). Heat- and light-induced reorganizations in the phycobilisome antenna of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Thermo-optic effect. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 750-756.
- Straus, N. A.** (1994). Iron deprivation: Physiology and gene regulation. En: Bryant, D. A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht: Springer.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J. y Schwede, T.** (2020). QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, **36**, 1765-1771.
- Suzuki, T., Yoshimura, H., Ehira, S., Ikeuchi, M. y Ohmori, M.** (2007). AnCrpA, a cAMP receptor protein, regulates *nif*-related gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 grown with nitrate. *FEBS Lett.*, **581**, 21-8.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J. y Von Mering, C.** (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.*, **49**, D605-d612.
- Tamary, E., Kiss, V., Nevo, R., Adam, Z., Bernát, G., Rexroth, S., Rögner, M. y Reich, Z.** (2012). Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 319-327.
- Tandeau De Marsac, N. y Houmard, J.** (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, **104**, 119-189.
- Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbe, J. y Campoy, S.** (2011). Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hild* operator in vivo and in vitro. *PLoS One*, **6**, e19711.
- Tomitani, A., Knoll, A. H., Cavanaugh, C. M. y Ohno, T.** (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5442-547.
- Traore, D. A., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J. L., Caux-Thang, C., Duarte, V. y Latour, J. M.** (2006). Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **61**, 1211-129.
- Traore, D. A., El Ghazouani, A., Jacquamet, L., Borel, F., Ferrer, J. L., Lascoux, D., Ravanat, J. L., Jaquinod, M., Blondin, G., Caux-Thang, C., Duarte, V. y Latour, J. M.** (2009). Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 53-59.
- Tseng, H.-J., Mcewan, A. G., Apicella, M. A. y Jennings, M. P.** (2003). OxyR acts as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*, **71**, 550-556.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. y Palmer, J. D.** (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**, 327-338.

- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. y Vollmer, W.** (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 123-136.
- Valladares, A., Flores, E. y Herrero, A.** (2016). The heterocyst differentiation transcriptional regulator HetR of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* forms tetramers and can be regulated by phosphorylation. *Mol. Microbiol.*, **99**, 808-819.
- Valladares, A., Muro-Pastor, A. M., Fillat, M. F., Herrero, A. y Flores, E.** (1999). Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the petH gene encoding ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.*, **449**, 159-164.
- Van Vliet, A. H., Baillon, M. L., Penn, C. W. y Ketley, J. M.** (1999). *Campylobacter jejuni* contains two fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J. Bacteriol.*, **181**, 6371-6376.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D. y Velankar, S.** (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.*, **50**, D439-d444.
- Vazquez-Bermudez, M. F., Herrero, A. y Flores, E.** (2002). 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glNA* promoter. *FEBS Lett.*, **512**, 71-74.
- Vermaas, W. F.** (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *eLS*.
- Videau, P., Rivers, O. S., Hurd, K., Ushijima, B., Oshiro, R. T., Ende, R. J., O'hanlon, S. M. y Cozy, L. M.** (2016). The heterocyst regulatory protein HetP and its homologs modulate heterocyst commitment in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, E6984-E6992.
- Videau, P., Rivers, O. S., Tom, S. K., Oshiro, R. T., Ushijima, B., Swenson, V. A., Philmus, B., Gaylor, M. O. y Cozy, L. M.** (2018). The *hetZ* gene indirectly regulates heterocyst development at the level of pattern formation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.*
- Vilhauer, L., Jarvis, J., Ray, W. K. y Helm, R. F.** (2014). The exo-proteome and exo-metabolome of *Nostoc punctiforme* (Cyanobacteria) in the presence and absence of nitrate. *Arch. Microbiol.*, **196**, 357-367.
- Vioque, A.** (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 6331-6337.
- Vollmer, W., Blanot, D. y De Pedro, M. A.** (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 149-167.
- Wandersman, C. y Delepelaire, P.** (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**, 611-647.
- Wang, B., Yang, J., Xu, C., Yi, L. y Wan, C.** (2020). Dynamic expression of intra- and extra-cellular proteome and the influence of epiphytic bacteria for *Nostoc flagelliforme* in response to rehydration. *Environ. Microbiol.*, **22**, 1251-1264.
- Wang, G., Xia, Y., Song, X. y Ai, L.** (2016). Common Non-classically Secreted Bacterial Proteins with Experimental Evidence. *Curr. Microbiol.*, **72**, 102-111.

- Wang, H. L., Postier, B. L. y Burnap, R. L.** (2004). Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J. Biol. Chem.*, **279**, 5739-5751.
- Wehrl, W., Niederweis, M. y Schumann, W.** (2000). The FtsH Protein Accumulates at the Septum of *Bacillus subtilis* during Cell Division and Sporulation. *J. Bacteriol.*, **182**, 3870-3873.
- Whitton, B. y Potts, M.** (2002). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Academic Publishers, The Netherlands.
- Winkenbach, F. y Wolk, C. P.** (1973). Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant Physiol.*, **52**, 480-483.
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M. y Carrell, R. W.** (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*, **85**, 337-341.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, **51**, 221-271.
- Wolk, C. P., Thomas, J., Shaffer, P. W., Austin, S. M. y Galonsky, A.** (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of <sup>13</sup>N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5027-5034.
- Wolk, C. P. E., A. And Elhai, J.** (1994). Heterocyst metabolism and development. *En: Bryant D. A. (ed.) The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 769-863.
- Wu, H.-J., Seib, K. L., Srikhanta, Y. N., Kidd, S. P., Edwards, J. L., Maguire, T. L., Grimmond, S. M., Apicella, M. A., Mcewan, A. G. y Jennings, M. P.** (2006). PerR controls Mn-dependent resistance to oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.*, **60**, 401-416.
- Wu, X., Lee, D. W., Mella, R. A. y Golden, J. W.** (2007). The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *asr1734* gene encodes a negative regulator of heterocyst development. *Mol. Microbiol.*, **64**, 782-794.
- Wyatt, P. J.** (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta*, **272**, 1-40.
- Xu, X., Risoul, V., Byrne, D., Champ, S., Douzi, B. y Latifi, A.** (2020). HetL, HetR and PatS form a reaction-diffusion system to control pattern formation in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *eLife*, **9**, e59190.
- Yegorov, Y., Sendersky, E., Zilberman, S., Nagar, E., Waldman Ben-Asher, H., Shimoni, E., Simkovsky, R., Golden, S. S., Liwang, A. y Schwarz, R.** (2021). A Cyanobacterial Component Required for Pilus Biogenesis Affects the Exoproteome. *mBio*, **12**.
- Yingping, F., Lemeille, S., Talla, E., Janicki, A., Denis, Y., Zhang, C. C. y Latifi, A.** (2014). Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (*alr0957*) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Environ Microbiol Rep*, **6**, 468-475.
- Zhang, C. C., Zhou, C. Z., Burnap, R. L. y Peng, L.** (2018a). Carbon/Nitrogen Metabolic Balance: Lessons from Cyanobacteria. *Trends Plant Sci.*, **23**, 1116-1130.
- Zhang, H., Wang, S., Wang, Y. y Xu, X.** (2018b). Functional Overlap of *hetP* and *hetZ* in Regulation of Heterocyst Differentiation in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **200**.

- Zhao, M. X., Jiang, Y. L., He, Y. X., Chen, Y. F., Teng, Y. B., Chen, Y., Zhang, C. C. y Zhou, C. Z.** (2010). Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 12487-92.
- Zhao, W., Guo, Q. y Zhao, J.** (2007a). A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 563-72.
- Zhao, W., Ye, Z. y Zhao, J.** (2007b). RbrA, a cyanobacterial rubrerythrin, functions as a FNR-dependent peroxidase in heterocysts in protection of nitrogenase from damage by hydrogen peroxide in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.*, **66**, 1219-30.

# Anexos

# ANEXOS

## Anexo I: Figuras y Tablas suplementarias

**Figura suplementaria S1.** Análisis TOMTOM de la caja FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.

**Tabla suplementaria S1.** Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

**Tabla suplementaria S2.** Genes expresados diferencialmente en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120

**Tabla suplementaria S3.** Genes expresados diferencialmente en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 tras 48 h en deficiencia de nitrógeno (BG11<sub>0</sub>)

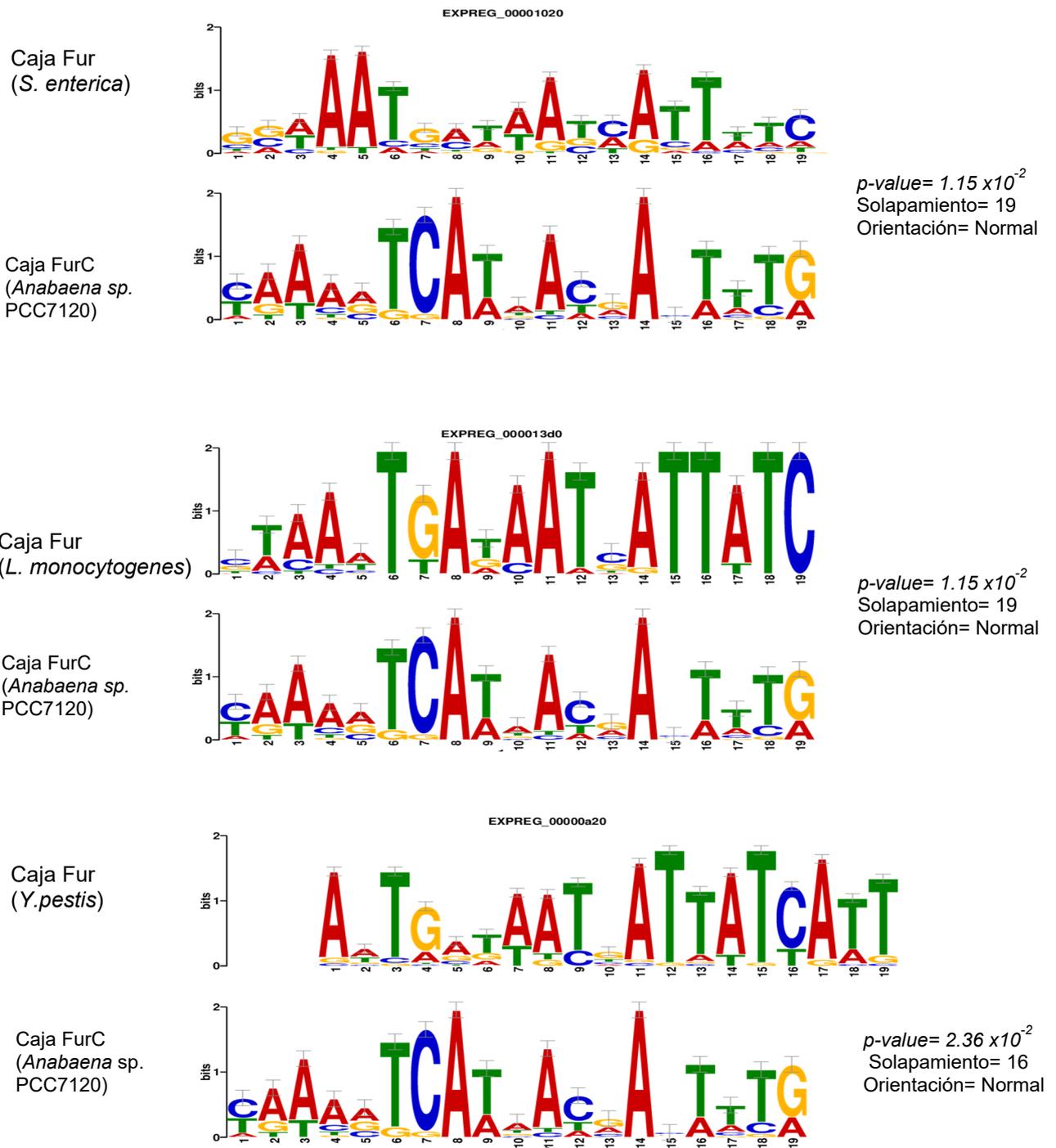
**Tabla suplementaria S4.** Genes que codifican proteínas hipotéticas o desconocidas cuya expresión está alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC en comparación con *Anabaena* sp. PCC7120.

**Tabla suplementaria S5.** Genes que codifican proteínas hipotéticas o desconocidas cuya expresión está alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC* EB2770FurC con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 tras 48 h en deficiencia de nitrógeno (BG11<sub>0</sub>)

**Tabla suplementaria S6.** Secuencias putativas de unión de FurC encontradas en las regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante búsqueda con la herramienta FIMO.

**Tabla suplementaria S7.** Lista de proteínas con abundancia relativa en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120.

**Figura suplementaria S1. Análisis TOMTOM de la caja FurC de *Anabaena* sp. PCC7120.** Los análisis TOMTOM se realizaron comparando la caja FurC obtenida con los motivos descritos para otros reguladores transcripcionales de procariontas disponibles en la base de datos "CollectF". Los parámetros obtenidos (*p-value*, solapamiento (número de columnas del motivo que solapan en el alineamiento) y la orientación) se incluyen a la derecha



**Tabla suplementaria S1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo**

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Secuencia amplificada
<i>EMSA</i>		
Pifpkn_up	AAAGATGAATTACTGGCG	<b>Control negativo de EMSA. Fragmento interno del gen <i>pkn22</i> (<i>ifpkn22</i>)</b>
Pifpkn_dw	CTGCAAAGTGGCAGAATA	
Palr4641_fw	GTCCAGAAGGCGGATTGTC	<b>Promotor del gen <i>alr4641</i> (<i>prxA</i>)</b>
Palr4641_rev	CTTAATTCTCCTTCAACTTATATCGG	
Pasl4146-up	GTTGCCACGGGGCAATGG	<b>Promotor del gen <i>asl4146</i> (<i>srxA</i>)</b>
Pasl4146-dw	CCGATGCGCCTGTCAATCC	
Pall1541_up	CCACCAAGCAGCTTTGAC	<b>Promotor del gen <i>all1541</i> (<i>ahpC</i>)</b>
Pall1541_dw	GGTGACTTGAGGAACTCTTTGAC	
Palr4404_up	CACAATATTAGTGCCTGATTAC	<b>Promotor del gen <i>alr4404</i></b>
Palr4404_dw	AGAGCCATAAGAGATTCCCT	
PCGT3_fw	GATCGCACCTACGGAAACG	<b>Promotor del gen <i>alr2375</i> (<i>CGT3</i>)</b>
PCGT3_rev	GATCGCACCTACGGAAACG	
pCpcB_for	GGATCTATAGCATTGTATAA	<b>Promotor del gen <i>alr0528</i> (<i>cpcB</i>)</b>
pCpcB_rev	TGTCATGGACTTTAATCTCC	
papcA_for	ATCCCTAGTATTGCTGTGAC	<b>Promotor del gen <i>alr0021</i> (<i>apcA</i>)</b>
papcA_rev	TCATTAATGGATTCCCTCCAG	
Nbla(2)_up	AATAGCTCATTCCAAGTGG	<b>Promotor del gen <i>asr4517</i> (<i>nblA</i>)</b>
Nbla(2)_dw	ATAAATTTACAGCAGGTTCAAT	
pPecB_for	AAGGCATTACAACCTTTATA	<b>Promotor del gen <i>alr0523</i> (<i>pecB</i>)</b>
pPecB_rev	GCATCGAGCATCTTTCTTTC	
pPecA_for	ATGGACGATCGCTGCTTAAA	<b>Promotor del gen <i>alr0524</i> (<i>pecA</i>)</b>
pPecA_rev	TTCATACTTCTCCTAATCTC	
pPecC_for	CTGGTTAAGCGAACTCAAC	<b>Promotor del gen <i>alr0525</i> (<i>pecC</i>)</b>
pPecC_rev	CTACTCATTTTGATAAACGC	
pCpcG4_for	ATCGCGCTGGTATTGTTAGA	<b>Promotor del gen <i>alr0537</i> (<i>cpcG4</i>)</b>
pCpcG4_rev	TGCCATGCTGAGTTATCC	
pApcC_for	AAGTAACCGCTAGCTTAGTT	<b>Promotor del gen <i>asr0023</i> (<i>apcC</i>)</b>
pApcC_rev	CGGGACATAATTTGAAATCT	
Palr1174_for	CATGGATGCCAGCGATAGATG	<b>Promotor del gen <i>alr1174</i> (<i>rbrA</i>)</b>
Palr1174_rev	GCTTCTAAGTTTTGCAGTGTAG	
Pall3914_for	CAAGTCATAGCTTGTTCCTG	<b>Promotor del gen <i>all3914</i></b>
Pall3914_rev	CAAACCATTCTTTAACTGGTAC	
PftsZ_up	ACTTCTCTAGAATTAGCTGTGCAT	<b>Promotor del gen <i>alr3858</i> (<i>ftsZ</i>)</b>
PftsZ_dw	TGTCATTGGATTCGGGAAGGT	
Pall4776_up	TTCGGTCTTAACTACCAGC	<b>Promotor del gen <i>all4776</i> (<i>ftsH</i>)</b>
Pall4776_dw	ATTGCCATAACTGGACATCA	
PhetZ_up	GCGTTTAGTTTATCCGCAA	<b>Promotor del gen <i>alr0099</i> (<i>hetZ</i>)</b>
PhetZ_dw	CTCAAGCATTGTTGTAGCCG	
PhenR_up	TTCCTTGAACCAAGATTTGC	

PhenR_dw	AACAAGCACCCAGTTACCTC	Promotor del operón <i>alr1085-86 (alr1085-henR)</i>
Palr3646_up	CTTTCTATACGGTGTCAAGTTTAC	Promotor del operón <i>alr3646-49</i>
Palr3646_dw	GTTCTTTCCGATATTGGTCATG	
Palr4973_up	CACCTCGGACACAATCAAAC	Promotor del operón <i>alr4973-75</i>
Palr4973_dw	GAGATTCCTGAATCGGTCTG	
PhglE2_up	TAAGGACAATAGAAGATATCCTAC	Promotor del operón <i>all1646-45 (hglE2-all1645)</i>
PhglE2_dw	CAATAGGTGTTTGTGTAAAGC	
PxisHI_up	GCAGAATGTGGCTTTACTAC	Promotor del operón <i>alr1461-62 (xisHI)</i>
PxisHI_dw	GAGCTGTTCTCACGATGTTATG	
PnifH2box_up	GCTGTAATCCTTATGCAATAGG	Promotor del gen <i>alr0874 (nifH2)</i>
PnifH2box_dw	CTAGAGTAATTTACTGGCTTG	
PnirA_up	TTCACTATTAGAGCATCGATTC	Promotor del operon <i>alr0607-12 (nirA-nrtABCD- narB)</i>
PnirA_dw	GCTTTGAATTTCTCAAACCTATTG	
Pall2026_up	GTAATCGGAAGTGTTCATGG	Promotor del gen <i>all2026</i>
Pall2026_dw	GTGCTTCAATTTCTTACGAGTC	
Pall2027_up	CAAACATTTCTCTGAAGAACTG	Promotor del gen <i>all2027</i>
Pall2027_dw	GATTTGTGCTTCAACATCTTACGAG	
P1hepC_up	GCCAATTAAGTTGTCATGATTAAG	Promotor del gen <i>alr2834 (hepC). Región distal</i>
P1hepC_dw	CCTAACCTTTGTAATATCCGCC	
P2hepC_up	GCGGATATTACAAAGGTTAG	Promotor del gen <i>alr2834 (hepC). Región proximal</i>
P2hepC_dw	CGCTTGTGATAATGTCTTTGG	
P1asr1734_up	GTTGATGTGAAAAGCTTTAAAAC	Promotor del gen <i>asr1734. Región proximal</i>
P1asr1734_dw	CATAGTTTTAGAGATTCTGTGC	
P2asr1734_up	GATTTTACTTTTGATAAAATTGCTC	Promotor del gen <i>asr1734. Región distal</i>
P2asr1734_dw	CGAAGATTGAATCTTCTGTGTC	
PpatA_up	GGTTTGAGCCAATAACTATACGTG	Promotor del gen <i>all0521 (patA)</i>
PpatA_dw	GTAATCGGAAGTGTTCATGG	
PnifH-1	GCGTGTGGCTCTTGTTTC	Promotor del operon <i>all1455-40 (nifHDK)</i>
PnifH-2	GGTTGGTTAGTTGGTCGG	
Palr4028_up	GCATCTTAGCCAAAATTCCAC	Promotor del operon <i>alr4028-33</i>
Palr4028_dw	TAAGTTGAGTTCCCATCTG	
Palr0290_up	TCCCATCTATAAGACAATGCC	Promotor del gen <i>alr0290</i>
Palr0290_dw	TGGGTTAGTAGGCTGCATT	
Pall0542_up	CCTTAGCTACCTCAGTAATA	Promotor del gen <i>all0542</i>
Pall0542_dw	GCCTGGCTTGCTGTAATATC	
Palr2294_up	CTCTCTTCATGTTATTGGC	Promotor del gen <i>alr2294</i>
Palr2294_dw	GCTGACAAGAATTGTGGTGAC	
Pall2165_up	AAATTCTGTAAATTAACAGTGC	Promotor del gen <i>all2165</i>
Pall2165_dw	GGGATGTAGTTTATGATTTAACCTG	
Palr2142_up	CGACATCACCTCTCTCGTGC	Promotor del gen <i>alr2142</i>
Palr2142_dw	CACCAATACCGCTACTAGCT	
Pall3913_up	CCGCCATCAATTGCCAAGT	Promotor del gen <i>all3913</i>

Pall3913_dw	CTTTCATCTGGGCGATATGATT	
Pall7335_up	CTAAACCCAACCGCTTAATCAG	Promotor del gen <i>all7335</i>
Pall7335_dw	CATTCAAACCAGAGCAATCCC	
Pall0323_up	CTGAAATTAATGGGAACCCTAG	Promotor del gen <i>all0323</i>
Pall0323_dw	CGGTAGATGTTAGTGTGGTTC	
Palr2572_up	AGGGCAGTTGTTAGATGCTATC	Promotor del gen <i>alr2572</i>
Palr2572_dw	CAGTTCCTGACCTTCGG	
Palr8535_up	AAATGATTGGCACTCTCATG	Promotor del gen <i>alr8535</i>
Palr8535_dw	GTAGCACGTAGACCAATTCCG	
Palr2902box_up	CATGGTAATTGCTTCTAAACTC	Promotor del gen <i>alr2902</i>
Palr2902box_dw	GTTTCAGTCGTAATTATTTGTG	
Pall7016_up	GTACATATACACCCAGACCAAG	Promotor del gen <i>all7016</i>
Pall7016_dw	GTAGTTCATGCTCACTAGGGG	
Palr7354_up	GACAGCGCCATAAGTACCAGCAG	Promotor del gen <i>alr7354</i>
Palr7354_dw	GATGCCTAACTTCAAGTAGCCATAGC	
Pall1649-47_up	GCAATAGGTTCCATCTTATAAATCCG	Promotor del gen <i>all1649-47</i>
Pall1649-47_dw	CAACTACCCAATTTGCTCAATTGG	
PwcaG_for	GAAGTCTGACCTAAAGCTTGCAA	Promotor del gen <i>all4826 (wcaG)</i>
PwcaG_rev	GAATTTCTGAGTTGGCTTTTAGC	
Pall7362_for	AAAGTTCAGTTAATGGTGGC	Promotor del gen <i>all7362 (nucA)</i>
Pall7362_rev	TCGCAGAGAGGAAAAGTAAG	
Palr3280_for	TTCTATGAAAACCAGTTGCAGAG	Promotor del gen <i>alr3280 (sigG)</i>
Palr3280_rev	AGAGTTTGTCAACTTGCACCGAT	
Palr9013_for	TAGGCGAGGGTGTATCAAGCT	Promotor del gen <i>alr9013</i>
Palr9013_rev	TAGCCGCTTTGAAGCCTAAG	
P4026-P1_up	CAAGGCTGCCCCACTCC	Promotor del gen <i>all4026 (iacT)</i> . Región proximal
P4026-P1_dw	GTGCCTGATCTACTTACTTTGCTCTGC	
P4026-P2_up	GCAGAGCAAAGTAAGTAGATCAGGCAC	Promotor del gen <i>all4026 (iacT)</i> . Región media
P4026-P2_dw	GCTGGGGCGATCGCATAACTTAAG	
P4026-P3_up	GTTATGCGATCGCCCCAGC	Promotor del gen <i>all4026 (iacT)</i> . Región distal
P4026-P3_dw	GACGCTATGAGATAGTGATCCTCTTTAAG	
Pall0473_up	CTAATCCTTAGTCACACGACAC	Promotor del gen <i>all0473 (zupT)</i>
Pall0473_dw	GGCATTGATGGGAGACTGAC	
Pall0879_up	GGTTTGATGTGAGCCGAG	Promotor del gen <i>all0879</i>
Pall0879_dw	CGTAAGGGTTGACGCGGTGC	
Palr4334_up	CCGTTGACCTAGATATTCCAG	Promotor del gen <i>alr4334 (pheA)</i>
Palr4334_dw	GTAGCTTGTCTGCATAAGTG	
Pall1123_up	GTGTAGGGGTGTAGGGATGTAG	Promotor del gen <i>all1123</i>
Pall1123_dw	GAATAGTGGGATCGTTTGTGTTG	
Pall1272_up	CAGCCTCCCTCGGTACATG	Promotor del gen <i>all1272 (glgP1)</i>
Pall1272_dw	CATTGAATGTGCGAATCGGC	
Pall4018_up	CCAGCAGAAGCAGAATTTCTG	Promotor del gen <i>all4018 (opcA)</i>

Pall4018_dw	CCGCTTCAATTCGTTTAGCG	
Palr4124_up	CAAGATACTCCCTGCTGGAT	Promotor del gen <i>alr4124</i>
Palr4124_dw	CTAGTCGGGTCTTGCCAG	
Palr0252_up	GAGTACATATTGGACATTCTCAG	Promotor del gen <i>alr0252</i>
Palr0252_dw	GACTTCAAATGATGCTTCCATG	
Pall0862_up	GTTTGTCTGATAGCGAGAATAG	Promotor del gen <i>all0862 (cmpR)</i>
Pall0862_dw	GTATCACTGAATACTTGACATG	
all3797_up	CAAAGCAGACTGCTATACACG	Promotor del gen <i>all3797 (fas1)</i>
all3797_dw	GCTTGCTTGATTACCCTC	
alr5164_up	GTTGACAAATTACAAGAGAGCC	Promotor del gen <i>alr5164 (degQ)</i>
alr5164_dw	CACCAACCACTAGTAGAGACAG	
Pall5346_up	CGCAGATAGCGAACGGGTAG	Promotor del gen <i>alr5346 (hgdC)</i>
Pall5346_dw	CATCTTGAAACCAAGTTGC	
Pasr2041_up	GATGATAATGGATCACAGGATG	Promotor del gen <i>asr2041</i>
Pasr2041_dw	TTGACCGATTTTTGGTTGTGC	
Palr3281_up	ATCACAGGTGTATCCTTGGG	Promotor del gen <i>alr3281</i>
Palr3281_dw	CAAAGCGATCGCGCTTAC	
Palr2137_up	GATGTTTGACCAATTGGTGGC	Promotor del gen <i>alr2137</i>
Palr2137_dw	GAGCGGTAGGCTCAAAGC	
Palr2325_up	CTGGTTAACACTTGTCTAATTAG	Promotor del gen <i>alr2325</i>
Palr2325_dw	GTGGCTGTACTCAATAAGGG	
Pall3578_up	GCCACAAAAGCTTACAATGGTG	Promotor del gen <i>all3578 (dnaeNI)</i>
Pall3578_dw	TAGCTGACTAGCCCCATCCAG	
Pall0067_up	GCCAAAGAGTATGAGTCGGG	Promotor del gen <i>all0067</i>
Pall0067_dw	GATAGAATAGGTTGTGCCGGG	
Palr3809_up	CTCCCCAAGGATTAGTATTGGG	Promotor del gen <i>alr3809 (carB)</i>
Palr3809_dw	GGGCATAGTCGTTGGGTTGG	
Pall2368_up	GCCTAACATAACCTGCATTC	Promotor del gen <i>all2368</i>
Pall2368_dw	CAATCAAGAAGACCTGGGGTG	
Pasr3992_up	GATAGTGCGCCATTTGATCTA	Promotor del gen <i>asr3992 (psbZ)</i>
Pasr3992_dw	CAACACAAGCGCTACCAAAGC	
Pall0945_up	CAGATGAAGCTGAAGCTCATTTG	Promotor del gen <i>all0945 (sdhB)</i>
Pall0945_dw	CTTCCATTGCTACCAACCAAA	
Palr2822_up	CAAGTTCTCTTGGTTACATTAGG	Promotor del gen <i>alr2822</i>
Palr2822_dw	GGCGGTAGCTGGTTAATCTTC	
Pall4441_up	CGCCGGCATATTGTTTAAATTGC	Promotor del gen <i>all4441</i>
Pall4441_dw	CCCGTAGGTTGGTATGACTAC	
alr4548-1	GCGTGTAGCCGATGCTCAAC	Promotor del gen <i>alr4548 (psbD)</i>
alr4548-2	CAGTCGTCTAGTACGTCAAAC	
PhetR1-up	GGGAAAGTCTTGTAGGTTAC	Promotor del gen <i>alr2339 (hetR)</i> Región distal
PhetR1-dw	CGCTTGATCAGATCGATG	
PhetR2-up	GTCTATAATTTCCCTCCAG	

PhetR2-dw	CTAATAAGTAACCTACAAG	Promotor del gen <i>alr2339 (hetR)</i> Región media
PhetR3-up	AACCCTTATGACAAAGGAC	Promotor del gen <i>alr2339 (hetR)</i> Región proximal
PhetR3-dw	CTGGAGGGAAAATTATAG	
<i>Real Time RT-PCR</i>		
<i>rnpB_fw</i>	AGCGGAACTGGTAAAAGACCA	<i>rnpB</i> housekeeping
<i>rnpB_rev</i>	GAGAGGTACTGGCTCGGTAAAC	
<i>ftsZ_for</i>	CGTTGGGACAGCCAGGTTT	<i>alr3858 (ftsZ)</i>
<i>ftsZ_rev</i>	CCAAAATTCAGCCCAGAGTGA	
<i>ftsH_for</i>	GCTTACCATGAAGTCGGACATG	<i>all4776 (ftsH)</i>
<i>ftsH_rev</i>	GTCCTCTGGGAATGAGGGTAACT	
<i>prxA_fw</i>	CCATCACCTACGGAACACAAGA	<i>alr4641 (prxA)</i>
<i>prxA_rev</i>	TCCTGATCAACTACAGCTGTTGCT	
<i>srxA_for</i>	CAAATTCGCGCGCCATT	<i>asl 4146 (srxA)</i>
<i>srxA_rev</i>	GCTGCAATCGATTCCATTAGG	
<i>all2556_for</i>	TTGTCAGCTGCTTTGCTGTTATTAG	<i>alr2556</i>
<i>all2556_rev</i>	AGTTTGCCCCCAAGTGCAT	
<i>GCT3_for</i>	GACGGCGGCGGTTATG	<i>alr2375 (CGT3)</i>
<i>GCT3_rev</i>	ACTCGCATCAACATGAACAATTTT	
<i>alr2503_for</i>	CGCGTTCAACTTTTCTGATATCA	<i>alr2503</i>
<i>alr2503_rev</i>	CACTGCTTGAGCATGACCTTTAGT	
<i>CGT1_for</i>	GCGACCAAGTACGCAAACCT	<i>alr3183 (CGT1)</i>
<i>CGT1_rev</i>	CGCGACCGGGAAACAA	
<i>all1541_for</i>	GCAGGTAAAACAGTCGCTGTCTT	<i>all1541 (ahpC)</i>
<i>all1541_rev</i>	CTCGTTGTAACCAGGTAGGTGAGTAG	
<i>alr4404_for</i>	AACTCCGTCTCACCTTACCTATC	<i>alr4404</i>
<i>alr4404_rev</i>	GGAATCGATGACTCGCAACA	
<i>sodA_fw</i>	CTAACCAAACCAACCACTACCA	<i>all0070 (sodA)</i>
<i>sodA_rev</i>	CCTTTGGCAGTTTTGAAGAGTTC	
<i>alr0998_fw</i>	ACCCACGGGATGTCATTATGA	<i>alr0998 (catA)</i>
<i>alr0998_rev</i>	TGGCAACGCACCTAAACCA	
<i>apcE_fw</i>	GGGCGATTTTCCCGAAA	<i>alr0020 (apcE)</i>
<i>apcE_rev</i>	CCGTCTGGTGTCTTACCAAAA	
<i>apcA_fw</i>	TCGTGAATGCTGATGCAGAAG	<i>alr0021 (apcA)</i>
<i>apcA_rev</i>	CCAGCGACGAAGCTCTTGAT	
<i>apcC_fw</i>	CGAACTACAAAACACCTACTTTACCAA	<i>asr0023 (apcC)</i>
<i>apcC_rev</i>	GTTGCGAGTTCCACTTTGATAATTT	
<i>pecC_fw</i>	TCCCTGAATTTGCCTAATGGA	<i>alr0525 (pecC)</i>
<i>pecC_rev</i>	TGCTGCGGAAACAAAGTTTG	
<i>pecF_fw</i>	GCTGCTGCTGTCTTTACAAGAA	<i>alr0527 (pecF)</i>
<i>pecF_rev</i>	GCGAACAACCTGGATCGGTTT	
<i>cpcB_fw</i>	AGTTGATTGCTCCTGGTGGTAAC	<i>alr0528 (cpcB)</i>
<i>cpcB_rev</i>	GATTTCCATGTCGCGTAAACAA	

<i>cpcC_fw</i>	GGGCCATCTGGAACATAATGATAGT	<i>alr0530 (cpcC)</i>
<i>cpcC_rev</i>	CGGCATTACCCAAGTTTTTCTT	
<i>cpcG4_fw</i>	CAGCCGCAAGTCCCAAGA	<i>alr0537 (cpcG4)</i>
<i>cpcG4_rev</i>	CGCTGCCAAATCTGCAAA	
<i>RT_hetZ_up</i>	CTGCGGGCGCAAACCTT	<i>alr0099 (hetZ)</i>
<i>RT_hetZ_dw</i>	CGGCGGCTTGTTTCGATAT	
<i>RT_henR_up</i>	GAAATGGTGACAGCCCAGACTT	<i>alr1086 (henR)</i>
<i>RT_henR_dw</i>	TCCTGTTTGCCATTTGACATCT	
<i>RT_alr3646_up</i>	CATGACCAATATCGGAAAGAAGCTG	<i>alr3646</i>
<i>RT_alr3646_dw</i>	GCGTACCTGTAGAAACATTCAAACC	
<i>RT_alr4973_up</i>	CCGTCGAGGATATTGGCTTACT	<i>alr4973</i>
<i>RT_alr4973_dw</i>	CCACTCGTGCATCGATATCG	
<i>hglE_for</i>	TGCAAACATGACGGGTAACG	<i>all1646 (hglE2)</i>
<i>hglE_rev</i>	TTGGGCGTAAAGATTTTCGATT	
<i>RT_xisH1_up</i>	GGGAGAAAATAGCAGTTGAAATTAAG	<i>alr1461(xisH)</i>
<i>RT_xisH1_dw</i>	TGATAAATTGCCCAAGGTTGT	
<i>RT_nifH2_up</i>	AAGCTGACTCCACCCGTTTG	<i>alr0874 (nifH2)</i>
<i>RT_nifH2_dw</i>	CGTTCAGCAGCCAAGTGAAG	
<i>RT_nrtABCD_up</i>	GACAGATATCGAAGTCATCAAGCAA	<i>alr0608 (nrtA)</i>
<i>RT_nrtABCD_dw</i>	CACCAGATGAGCCAATTTTAAAGTT	
<i>RT_hepC_up</i>	GCACATAAACCTATTTTTCTCAGTAAACC	<i>alr2834 (hepC)</i>
<i>RT_hepC_dw</i>	CCAGTCTATTAATCTCCACAACCATCT	
<i>RT_asr1734_up</i>	AATTCGGTTAGTTGAGGAAAAAA	<i>asr1734</i>
<i>RT_asr1734_dw</i>	GATCCTTCCGTTAGGGCATCT	
<i>RT_patA_up</i>	CAACAGCATGGGCGTGTC	<i>all0521 (patA)</i>
<i>RT_patA_dw</i>	TGTTAACTGGTATCTGGTTATGTTCTGTAG	
<i>RT_nifH_up</i>	TGCGCCGTATGACCGTTA	<i>all1455 (nifH)</i>
<i>RT_nifH_dw</i>	GCTAATGCGCGGTACTCTTGA	
<i>Asl3849_for</i>	GCAACTGCATTTTTGCCTTCT	<i>asl3849</i>
<i>Asl3849_rev</i>	CAACCAATTACGGGAACGAAGA	
<i>FecB_for</i>	CCTGCACCCCCAACTATAACC	<i>alr4028</i>
<i>FecB_rev</i>	TGTGATATTCTACCGCAAACCT	
<i>lacT_for</i>	GCGTTTCCGCAGAACAAAA	<i>all4026 (iacT)</i>
<i>lacT_rev</i>	TAGTGGTGCAATTGGTTTGTAGTCA	
<i>All1648_for</i>	GATTTAACCGCCCAGGGAAT	<i>all1648</i>
<i>All1648_rev</i>	CGGTTCCATCATGGGAGAAT	
<i>Alr7354_for</i>	TTACGAACGCGACTCCAAGA	<i>alr7354</i>
<i>Alr7354_rev</i>	GCCGAGCGGATGGACTT	
<i>NucA_for</i>	CCAAGTGCCACCATTAAGTAA	<i>all7362 (nucA)</i>
<i>NucA_rev</i>	CGTTGCACCACTGGGATTT	
<i>SigG_for</i>	ACGCAAGCGGGTTGTAAGTC	<i>alr3280 (sigG)</i>
<i>SigG_rev</i>	CAATCCATTTGCCATCATCT	

all1272_fw	AAGTCACGGCTTACCACATGAA	<b><i>all1272 (glgP1)</i></b>
all1272_rev	CTCAACCCCTCTTCTTGAATTAACA	
all0862_fw	CGCCGAATTCAGCATTCTG	<b><i>all0862 (cmpR)</i></b>
all0862_rev	CGATGGGTAAACCATGTACCAA	
all4018_fw	CCCAGAATTGCTGATGAAATC	<b><i>all4018 (opcA)</i></b>
all4018_rev	CAATGGGAAACAGGGCAATAA	
alr5164_fw	CCTCTATTGCGTCGATTTTTTCG	<b><i>alr5164 (degQ)</i></b>
alr5164_rev	CGAACCTGTACCCCTCTCAATT	
asr3992_fw	GTGTTGGTGTCTTTTGCCTAGTTGT	<b><i>asr3992 (psbZ)</i></b>
asr3992_rev	ACCAAGCCAAAGGAGCTTTTT	
all3797_fw	GAGCCTCCCTATAACCGTGGTA	<b><i>all3797 (fas1)</i></b>
all3797_rev	TGTTGCGGGTTGGGTTTC	
alr4334_fw	TTTTACATCCCTATTCCAGCATTG	<b><i>alr4334 (pheA)</i></b>
alr4334_rev	ACAGGCACAACAGCTAATTGAGTT	
all3578_fw	ACATCTACACCCACCCAAACG	<b><i>all3578 (dnaeNI)</i></b>
all3578_rev	TCTGCGCCACATTCCTTACA	
all0473_fw	CATTTTCCTTAATAGTCCCTGGTACTG	<b><i>all0473 (zupT)</i></b>
all0473_rev	GACCATAATTAAGCGGCATTGA	
alr2325_up	GGCGCACCTGTGGAGATG	<b><i>alr2325 (ancrpB)</i></b>
alr2325_dw	CCAAAAAATCACCCCTTCCTA	
5346qPCR_fw	TCCACGTTTCTCCGCATCA	<b><i>all5346 (hgdC)</i></b>
5346qPCR_rev	GATCAGCACCTGGTTAAGAGTGA	
RT_hetR fw	CGCTATGCGAGCCTTAGAAGA	<b><i>alr2339 (hetR)</i></b>
RT_hetR rv	CAGTTCCTGCATGGCTTCATC	

**Tabla suplementaria S2. Genes expresados diferencialmente en la estirpe de sobreexpresión de *furC* con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120**

Gen/rol <sup>a</sup>	Fold change	EMSA <sup>b</sup>
<b>Fotosíntesis</b>		
<i>PSI</i>		
<i>all1365</i> ; <i>cytM</i> ; Cytochrome	2.85	
<i>asl3849</i> ; <i>psaI</i> precursor; Photosystem I protein	4.29	-
<i>PSII</i>		
<i>all3572</i> ; <i>psbAIV</i> ; Photosystem II protein D1	-22.85	+
<i>alr3727</i> ; <i>psbAll</i> ; Photosystem II protein D1	2.95	-
<i>asl0885</i> ; <i>psbK</i> ; Photosystem II protein	3.53	-
<i>asr0941</i> ; <i>psbX</i> ; Photosystem II protein	5.49	-
<i>Carotenoides</i>		
<i>all4826</i> ; <i>wcaG</i> ; GDP-fucose synthase	-2.85	-
<b>Metabolismo del hierro</b>		
<i>all1648</i> ; Similar to polyketide synthase	2.94	-
<i>all4025</i> ; <i>schE</i>	2.86	-
<i>all4026</i> ; <i>iacT</i> ; Similar to TonB-dependent receptor	4.36	-
<i>alr4028</i> ; TonB-dependent receptor	11.51	+
<i>alr4030</i> ; Putative ferredoxin	5.54	+
<i>alr4031</i> ; <i>fecB</i> ; ABC transporter, periplasmic-binding protein	4.51	+
<i>alr4032</i> ; <i>fecD3</i> ; iron(III) ABC transporter, permease protein	4.51	+
<i>alr4033</i> ; <i>fecE3</i> ; Ferrichrome ABC transporter, ATP-binding protein	4.51	+
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>		
<i>all2027</i> ; Similar to nitrile hydratase	3.81	-
<i>all2026</i> ; Similar to nitrile hydratase	4.18	-
<i>alr3280</i> ; <i>sigG</i> ; RNA polymerase sigma-E factor	-3.35	-
<b>Estrés oxidativo y detoxificación</b>		
<i>alr2142</i> ; Oxidoreductase	5.00	-
<i>alr4641</i> ; <i>prxA</i> ; Peroxiredoxin	-3.28	(+)
<i>alr4686</i> ; Cytochrome P450	2.95	
<i>alr7354</i> ; Glutathione S-transferase	-10.61	-
<b>Envuelta celular</b>		
<i>alr0290</i> ; Similar to s-layer associated multidomain endoglucanase	3.60	-
<i>alr4060</i> ; Probable alginate O-acetylation protein	4.15	
<b>Metabolismo energético</b>		
<i>all3913</i> ; Succinyl-CoA synthetase alpha chain	642.69	+
<i>all7335</i> ; 6-phosphofructokinase	650.00	-
<b>Regulación transcripcional</b>		
<i>all2035</i> ; Transcriptional regulator	3.19	
<i>all7016</i> ; Transcriptional regulator	650.00	+
<i>alr0957</i> ; <i>furC</i> ; Ferric uptake regulator	38.28	(+)
<i>alr1976</i> ; Transcriptional regulator	-13.00	

<b>Transducción de señales</b>		
	<i>all0323</i> ; Serine/threonine kinase	650.00 -
	<i>alr2572</i> ; Two-component sensor histidine kinase; Chk34	-3.04 -
	<i>alr8535</i> ; Two-component response regulator	650.00 -
	<i>alr9013</i> ; Two-component response regulator	-49.60 +
<b>Degradación del DNA</b>		
	<i>all7362</i> ; <i>nucA</i> ; Sugar-non-specific nuclease	-6.89 -
	<i>all7377</i> ; Probable acid phosphatase	-13.87
	<i>alr7333</i> ; Putative nuclease	650.00
	<i>alr7361</i> ; <i>nuiA</i> , Sugar-non-specific nuclease inhibitor	-3.82
	<i>alr7381</i> ; Putative nuclease	-11.74
	<i>alr7382</i> ; Putative nuclease	-6.39
<b>Transporte a través de membrana</b>		
	<i>all0563</i> ; General secretion pathway protein G	7.35
	<i>all7010</i> ; <i>hlyD</i> ; Fusion protein, similar to hemolysin export system membrane	26.55
	<i>all7315</i> ; <i>hlyB</i> ; ABC transporter ATP-binding protein, hemolysin secretion protein	32.51
<b>Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos</b>		
	<i>all2347</i> ; <i>menB</i> ; Naphthoate synthase	-2.91
	<i>all4365</i> ; <i>chlH</i> ; Protoporphyrin IX magnesium chelatase	4.76
	<i>alr1241</i> ; 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	2.85
<b>Glicosiltransferasas</b>		
	<i>all4420</i> ; Glycosyltransferase	3.34
	<i>alr0555</i> ; Putative acetyltransferase	2.83
	<i>alr3069</i> ; Probable glycosyltransferase	3.28
	<i>alr3070</i> ; Probable glycosyltransferase	3.46
	<i>alr3073</i> ; Probable glycosyltransferase	3.17
	<i>alr7015</i> ; Aminoglycoside N <sup>6</sup> -acetyltransferase	650.00
<b>Transposasas</b>		
	<i>all3371</i>	4.72
	<i>all5207</i>	10.41
	<i>all7008</i>	304.44
	<i>all7268</i>	-50.90
	<i>alr1157</i>	4.03
	<i>alr7321</i>	650.00
	<i>alr7323</i>	-650.00
	<i>alr7350</i>	-4.86
	<i>alr7386</i>	-6.93
	<i>alr8510</i>	-50.90
<b>Adaptación y condiciones atípicas</b>		
	<i>alr1240</i> ; <i>zam</i> ; Protein conferring resistance to acetazolamide	4.51
	<i>asl0514</i> ; CAB/ELIP/HLIP superfamily	14.44
	<i>asl3726</i> ; CAB/ELIP/HLIP superfamily	3.71
<b>Otros</b>		
	<i>all0778</i> ; Similar to serine protease inhibitor	-4.41
	<i>all2681</i> ; <i>idgB</i> ; Similar to indigoidine synthesis protein	-3.53
	<i>all7348</i> ; Lethal leaf-spot 1 homolog	20.78
	<i>all7369</i> ; Site-specific DNA-methyltransferase	-14.52
	<i>alr0764</i> ; <i>hoxY</i> ; Hydrogenase small subunit	2.82

<b><i>alr4058</i></b> ; Similar to isovaleryl-CoA dehydrogenase	4.29
<b><i>alr4153</i></b> ; Spo0M homolog	2.96
<b><i>alr4990</i></b> ; O-6-alkylguanine-DNA/cysteine-protein methyltransferase	3.62
<b><i>alr8034</i></b> ; Similar to mobilization protein Tral	-15.74
<b><i>alr8509</i></b> ; Similar to mobilization protein	-50.90

---

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>b</sup> El resultado de la validación de los genes seleccionados por ensayos de EMSA se indica como +/- . Los genes descritos previamente como dianas de FurC en (Yingping et al., 2014) se muestran con el símbolo (+)

**Tabla suplementaria S3. Genes expresados diferencialmente en la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 tras 48 h en deficiencia de nitrógeno (BG11<sub>0</sub>)**

Gen/rol <sup>a</sup>	Fold change	EMSA <sub>b</sub>
<b>Fotosíntesis</b>		
<i>PSI</i>		
<i>all0107</i> ; <i>psaL</i> ; Photosystem I subunit XI	-3.22	
<i>asl0108</i> ; <i>psaJ</i> ; Photosystem I subunit IX	-3.75	
<i>asr1283</i> ; <i>psaX</i> ; Photosystem I 4.8 kDa protein	-3.44	
<i>asr3463</i> ; <i>psaC</i> ; Photosystem I iron-sulfur center	-4.13	
<i>PSII</i>		
<i>all3572</i> ; <i>psbAIV</i> ; Photosystem II protein D1	-36.19	+
<i>all3854</i> ; <i>psbO</i> ; Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	-3.29	
<i>all4444</i> ; <i>flv2</i> ; Flavoprotein	8.94	
<i>all4446</i> ; <i>flv4</i> ; Flavoprotein	20.02	
<i>alr3727</i> ; <i>psbAll</i> ; Photosystem II protein D1	9.12	-
<i>alr4592</i> ; <i>psbAIII</i> ; Photosystem II protein D1	3.55	
<i>asr3847</i> ; <i>psbL</i> ; Photosystem II reaction center protein L	-7.25	
<i>Ficobilisomas</i>		
<i>all0450</i> ; <i>apcA2</i> ; Putative allophycocyanin subunit alpha 2	3.55	
<i>all5292</i> ; <i>cpcS2</i> ; Putative phycocyanobilin lyase	3.25	
<i>alr0020</i> ; <i>apcE</i> ; Phycobilisome core-membrane linker protein	-3.57	
<i>alr0021</i> ; <i>apcA</i> ; Allophycocyanin alpha subunit	-5.58	(+)
<i>alr0022</i> ; <i>apcB</i> ; Allophycocyanin subunit beta	-7.22	(+)
<i>alr0523</i> ; <i>pecB</i> ; Phycoerythrocyanin subunit beta	-6.94	
<i>alr0524</i> ; <i>pecA</i> ; Phycoerythrocyanin alpha chain	-6.79	
<i>alr0525</i> ; <i>pecC</i> ; Phycobilisome linker polypeptide. phycoerythrocyanin-associated. rod	-6.10	
<i>alr0526</i> ; <i>pecE</i> ; Bilin biosynthesis protein	-3.46	
<i>alr0527</i> ; <i>pecF</i> ; Bilin biosynthesis protein	-4.65	
<i>alr0528</i> ; <i>cpcB</i> ; C-phycocyanin subunit beta	-9.77	(+)
<i>alr0529</i> ; <i>cpcA</i> ; C-phycocyanin alpha chain	-13.88	(+)
<i>alr0530</i> ; <i>cpcC</i> ; Phycobilisome linker polypeptide. phycocyanin-associated. rod	-6.32	(+)
<i>alr0532</i> ; <i>cpcE</i> ; Phycocyanobilin lyase subunit alpha	-6.18	(+)
<i>alr0533</i> ; <i>cpcF</i> ; Phycocyanobilin lyase subunit beta	-4.05	
<i>alr0536</i> ; <i>cpcG3</i> ; Rod-core linker protein 3	-3.41	
<i>alr0537</i> ; <i>cpcG4</i> ; Rod-core linker protein 4	-4.09	(+)
<i>asr0531</i> ; <i>cpcD</i> ; Rod-capping linker protein	-4.00	(+)
<i>Carotenoides</i>		
<i>alr3189</i> ; <i>crtW</i> ; Beta-carotene ketolase	4.08	

<i>all3432</i> ; undecaprenyl pyrophosphate synthetase	25.90	
<i>Biosíntesis de clorofila y porfirinas</i>		
<i>all1743</i> ; <i>por</i> ; Protochlorophyllide oxido-reductase	-2.86	
<b>Respiración</b>		
<i>all1842</i> ; <i>mrpD</i> ; NADH dehydrogenase	3.49	
<i>alr5211</i> ; Probable NADH dehydrogenase	3.57	
<i>asl0009</i> ; <i>atpH</i> ; ATP synthase subunit c	-4.00	
<b>Metabolismo del hierro</b>		
<i>all1100</i> ; Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein	3.14	
<i>all1648</i> ; Similar to polyketide synthase	4.65	-
<i>all1649</i> ; Similar to polyketide synthase	4.14	-
<i>all2609</i> ; Iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein	2.83	
<i>all4025</i> ; <i>schE</i>	3.59	-
<i>alr1382</i> ; <i>futA</i> ; Ferric iron-binding periplasmic protein of ABC transporter	4.01	
<i>alr1384</i> ; <i>futC</i> ; ABC transporter ATP-binding protein	4.13	
<i>alr4031</i> ; <i>fecB3</i> ; Ferrichrome ABC transporter. ATP-binding protein	3.01	+
<i>alr4032</i> ; <i>fecD3</i> ; Permease protein of iron(III) ABC transporter	3.01	+
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>		
<i>all1951</i> ; <i>urtA</i> ; ABC-type urea permease	3.25	
<i>all2026</i> ; Similar to nitrile hydratase	12.85	-
<i>all2027</i> ; Similar to nitrile hydratase	6.79	-
<i>alr0608</i> ; <i>nrtA</i> ; Nitrate transport protein	3.59	-
<i>alr0609</i> ; <i>nrtB</i> ; Nitrate transport permease protein	3.45	-
<i>alr0610</i> ; <i>nrtC</i> ; Nitrate transport ATP-binding protein	4.59	-
<i>alr0611</i> ; <i>nrtD</i> ; Nitrate transport ATP-binding protein	3.74	-
<b>Diferenciación del heterocisto y fijación de N<sub>2</sub></b>		
<i>all1646</i> ; <i>hglE2</i> ; Heterocyst glycolipid synthase	5.11	-
<i>all1692</i> ; <i>sigC</i> ; RNA polymerase sigma-C factor	4.60	-
<i>all4432</i> ; Probable exopolysaccharide protein	3.86	
<i>alr0099</i> ; <i>hetZ</i>	5.59	+
<i>alr0874</i> ; <i>nifH2</i> ; Nitrogenase reductase	-7.45	+
<i>alr1086</i> ; <i>henR</i> ; Two-component response regulator	3.14	-
<i>alr1174</i> ; <i>rbrA</i> ; Rubrerythrin	4.33	+
<i>alr1461</i> ; <i>xisH</i> ; FdxN element excision controlling factor protein	3.03	+
<i>alr1462</i> ; <i>xisI</i> ; FdxN element excision controlling factor protein	3.03	+
<i>alr2803</i> ; <i>nifJ</i> ; Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	-3.67	
<i>alr2834</i> ; <i>hepC</i>	3.32	+
<i>alr3646</i> ; Transcriptional regulator	4.92	-
<i>alr3647</i> ; <i>devB</i> homolog; Heterocyst specific ABC-transporter	3.94	-
<i>alr3649</i> ; <i>devA</i> homolog; Heterocyst specific ABC-transporter	2.87	-
<i>alr4973</i> ; <i>devB</i> homolog; Heterocyst specific ABC-transporter	10.10	+
<i>alr4974</i> ; <i>devC</i> homolog; Heterocyst specific ABC-transporter	7.68	+

<i>alr4975</i> ; <i>devA</i> homolog; Heterocyst specific ABC-transporter.	4.64	+
<i>asr0773</i> ; Probable mo-dependent nitrogenase	17.25	
<i>asr1734</i> ; Heterocyst development negative regulator	5.60	+
<b>Estrés oxidativo y detoxificación</b>		
<i>alr0672</i> ; Similar to vanadium chloroperoxidase	14.74	
<i>alr2948</i> ; Putative zinc-binding oxidoreductase	3.09	
<i>alr4686</i> ; Cytochrome P450 family 110	3.75	
<i>alr7354</i> ; Glutathione S-transferase	-9.15	-
<b>Envuelta celular</b>		
<i>all2290</i> ; Similar to polysaccharide biosynthesis export protein	3.24	
<i>all2806</i> ; Probable alpha-glucan phosphorylase	4.01	
<i>all2941</i> ; Probable peptidoglycan binding protein	2.95	
<i>all4126</i> ; Dolichol-phosphate mannosyltransferase	4.95	
<i>all4422</i> ; UDP-N-acetyl-D-mannosamine transferase	5.06	
<i>all4430</i> ; Probable polysaccharide biosynthesis protein	3.02	
<i>alr0290</i> ; Similar to s-layer associated multidomain endoglucanase	3.35	-
<i>alr4112</i> ; <i>murD</i> ; UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	-5.17	
<b>Metabolismo energético</b>		
<i>all3913</i> ; Succinyl-CoA synthetase alpha chain	322.09	+
<i>all3914</i> ; Succinyl-CoA synthetase beta chain	397.78	+
<i>all4131</i> ; Phosphoglycerate kinase	-2.83	
<i>all7335</i> ; 6-Phosphofructokinase	650.00	-
<i>alr1404</i> ; Serine acetyltransferase	-3.30	
<b>Regulación transcripcional</b>		
<i>all0345</i> ; Transcriptional regulator	5.74	
<i>all1651</i> ; Transcriptional regulator	3.50	
<i>all2035</i> ; Transcriptional regulator	5.53	
<i>all7016</i> ; Transcriptional regulator; heme-binding GAF protein	650.00	+
<i>alr0957</i> ; <i>furC</i> ; Ferric uptake regulator	42.19	(+)
<i>alr1941</i> ; Transcriptional regulator. TetR family	-4.14	
<i>alr1976</i> ; Transcriptional regulator	-15.08	
<b>Transducción de señales</b>		
<i>all0926</i> ; <i>pilH</i> ; Two-component response regulator	3.48	
<i>all1068</i> ; Two-component hybrid sensor and regulator	3.84	
<i>all1071</i> ; <i>pixH</i> ; Two-component response regulator	3.25	
<i>all1281</i> ; Two-component response regulator	3.43	
<i>all2165</i> ; Two-component response regulator. PATAN domain	3.20	+
<i>all3359</i> ; Two-component sensor histidine kinase	2.84	
<i>all3564</i> ; Two-component sensor histidine kinase	2.99	
<i>all3788</i> ; Two-component response regulator	4.35	
<i>all4687</i> ; Serine/threonine kinase with two-component sensor domain	2.93	
<i>all5323</i> ; <i>rcaC</i> homolog; Two-component transcription regulator	3.69	

<i>alr0264</i> ; Two-component system. regulatory protein	4.80	
<i>alr0354</i> ; Serine/threonine kinase with two-component sensor domain	-39.04	
<i>alr0709</i> ; Serine/threonine kinase with two-component sensor domain	2.99	
<i>alr0774</i> ; Two-component response regulator	7.51	
<i>alr3732</i> ; <i>pknE</i> ; Protein serine-threonine kinase	3.55	
<i>alr9013</i> ; Two-component response regulator	-18.59	+
<b>Transcripción</b>		
<i>all2284</i> ; <i>rsbW</i> ; Sigma-B activity negative regulator	3.66	
<i>alr3758</i> ; Anti-sigma factor antagonist	2.86	
<b>Traducción</b>		
<i>all1862</i> ; Similar to peptidase	3.07	
<i>all3969</i> ; <i>rps14</i> ; 30S ribosomal protein S14	-3.53	
<i>all4199</i> ; <i>rps5</i> ; 30S ribosomal protein S5	-4.23	
<i>all4201</i> ; <i>rpl6</i> ; 50S ribosomal protein L6	-2.91	
<i>all4203</i> ; <i>rpl5</i> ; 50S ribosomal protein L5	-2.96	
<i>all4205</i> ; <i>rpl14</i> ; 50S ribosomal protein L14	-2.96	
<i>all4212</i> ; <i>rpl2</i> ; 50S ribosomal protein L2	-4.17	
<i>all4340</i> ; <i>rps12</i> ; 30S ribosomal protein S12	-7.17	
<i>alr1381</i> ; <i>prcA</i> ; Trypsin	4.72	
<i>alr2737</i> ; <i>rps4</i> ; 30S ribosomal protein S4	-3.40	
<i>alr4057</i> ; Similar to peptide synthetase	3.24	
<i>alr5302</i> ; <i>rpl10</i> ; 50S ribosomal protein L10	-3.87	
<i>alr5303</i> ; <i>rpl12</i> ; 50S ribosomal protein L7/L12	-4.35	
<i>asl4204</i> ; <i>rpl24</i> ; 50S ribosomal protein L24	-2.96	
<i>asl4206</i> ; <i>rps17</i> ; 30S ribosomal protein S17	-3.01	
<b>Degradación del DNA</b>		
<i>all7362</i> ; <i>nucA</i> ; Sugar-non-specific	-3.52	-
<i>all7377</i> ; Probable acid phosphatase	-17.03	
<b>Transporte a través de membrana</b>		
<i>all0322</i> ; <i>sbpA</i> ; Sulfate-binding protein	-2.88	
<i>all4389</i> ; ABC transporter ATP-binding protein	3.36	
<i>all7010</i> ; <i>hlyD</i> ; Similar to hemolysin export system membrane fusion protein	25.58	
<i>all7315</i> ; <i>hlyB</i> ; ABC transporter ATP-binding protein. hemolysin secretion protein	67.64	
<i>alr7014</i> ; ABC transporter ATP-binding protein	650.00	
<b>Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos</b>		
<i>all2029</i> ; Heme biosynthesis protein	4.77	
<i>alr2051</i> ; Gamma-glutamyltranspeptidase	4.30	
<i>alr3125</i> ; <i>ho2</i> ; Heme oxygenase	-3.29	
<b>Metabolismo de ácidos grasos, fosfolípidos y esteroides</b>		
<i>all0968</i> ; <i>fabG</i> ; 3-Ketoacyl-acyl carrier protein reductase	6.05	
<i>all3634</i> ; Similar to esterase	3.33	

<b><i>all4063</i></b> ; Phosphatidylglycerophosphate synthase	3.57
<b>Procesos celulares</b>	
<b><i>all1069</i></b> ; <i>pixJ</i> ; Methyl-accepting chemotaxis protein	3.19
<b><i>all2033</i></b> ; <i>minD</i> ; Cell division inhibitor	4.43
<b><i>all2162</i></b> ; Methyl-accepting chemotaxis protein	3.06
<b><i>all4429</i></b> ; <i>hlpA</i> ; similar to hemolytic protein	3.15
<b><i>alr1031</i></b> ; General secretion pathway protein D	4.56
<b>Glicosiltransferasas</b>	
<b><i>all2285</i></b> ; Glucosyltransferase	3.15
<b><i>all2286</i></b> ; Glucosyltransferase	3.15
<b><i>all2287</i></b> ; Glucosyltransferase	3.15
<b><i>all2291</i></b> ; Glycosyltransferase	3.24
<b><i>all2292</i></b> ; Probable glycosyltransferase	3.24
<b><i>all4421</i></b> ; Glycosyltransferase	4.48
<b><i>all4425</i></b> ; Probable glucosyltransferase	4.84
<b><i>all4426</i></b> ; Probable glucosyltransferase	3.26
<b><i>all5119</i></b> ; Probable glycosyltransferase	3.09
<b><i>alr0075</i></b> ; Putative glycosyltransferase	4.57
<b><i>alr0555</i></b> ; Putative acetyltransferase	7.61
<b><i>alr0558</i></b> ; Probable glycosyltransferase	2.91
<b><i>alr0557</i></b> ; Probable glycosyltransferase	3.26
<b><i>alr1668</i></b> ; Probable glycosyltransferase	3.24
<b><i>alr3069</i></b> ; Probable glycosyltransferase	2.86
<b><i>alr5203</i></b> ; Probable glycosyltransferase	3.22
<b><i>alr5223</i></b> ; Glycosyltransferase	10.46
<b><i>alr5235</i></b> ; Probable glycosyltransferase	4.05
<b><i>alr5237</i></b> ; Probable glycosyltransferase	4.05
<b><i>alr5239</i></b> ; Glycosyltransferase	4.27
<b><i>alr5241</i></b> ; Glycosyltransferase	3.40
<b><i>alr7015</i></b> ; Aminoglycoside N6'-acetyltransferase	650.00
<b>Transposasas</b>	
<b><i>all3371</i></b>	2.83
<b><i>all5207</i></b>	13.67
<b><i>all7008</i></b>	96.35
<b><i>all7268</i></b>	-38.31
<b><i>alr1853</i></b>	-650.00
<b><i>alr7323</i></b>	-38.31
<b><i>alr7386</i></b>	-10.66
<b><i>alr8510</i></b>	-3.27
<b>Adaptación y condiciones atípicas</b>	
<b><i>alr1240</i></b> ; Zam protein	3.27
<b><i>asl0514</i></b> ; CAB/ELIP/HLIP superfamily	10.80
<b>Otros</b>	

<b><i>all0220</i></b> ; Isopentenyl transferase	4.84
<b><i>all0475</i></b> ; Probable short-chain dehydrogenase	5.28
<b><i>all0478</i></b> ; WD-40 repeat protein	3.05
<b><i>all1696</i></b> ; Similar to fibrinogen-binding protein	6.80
<b><i>all1750</i></b> ; WD-repeat containing protein	-2.90
<b><i>all2037</i></b> ; Probable galactosyltransferase	3.46
<b><i>all2248</i></b> ; <i>gvfP</i> ; Gas vesicle protein	3.31
<b><i>all2252</i></b> ; <i>gvpC</i> ; Gas vesicle protein C	-3.30
<b><i>all2443</i></b> ; <i>pilT</i> ; Twitching motility protein	3.68
<b><i>all3983</i></b> ; Similar to surface layer protein	3.11
<b><i>all4427</i></b> ; Similar to phytanoyl-CoA hydroxylase	3.56
<b><i>alr0556</i></b> ; DegT/DnrJ/EryC1/StrS family	5.82
<b><i>alr0766</i></b> ; <i>hoxH</i> ; Hydrogenase large subunit	2.90
<b><i>alr1276</i></b> ; Putative acetyl transferase	3.72
<b><i>alr1423</i></b> ; <i>hupW</i> ; Hydrogenase maturation protease	-3.93
<b><i>alr1576</i></b> ; Dehydrogenase subunit	2.95
<b><i>alr1965</i></b> ; ATP phosphoribosyltransferase	-3.43
<b><i>alr2190</i></b> ; Alpha-amylase	3.17
<b><i>alr2465</i></b> ; Probable DHNA-CoA thioesterase	3.52
<b><i>alr2526</i></b> ; Luciferase-alpha subunit	-3.62
<b><i>alr2791</i></b> ; WD-repeat protein	7.71
<b><i>alr3370</i></b> ; <i>spsA</i> ; Sucrose-phosphate synthase	5.12
<b><i>alr3393</i></b> ; <i>brkB</i> ; Similar to serum-resistance protein	3.29
<b><i>alr3620</i></b> ; Type I restriction modification enzyme M subunit	3.08
<b><i>alr4058</i></b> ; Similar to isovaleryl-CoA dehydrogenase	5.96
<b><i>alr4153</i></b> ; Spo0M homolog	4.60
<b><i>alr4823</i></b> ; Similar to glucosyl-1-phosphate transferase	3.62
<b><i>alr5368</i></b> ; Sugar ABC transporter. permease protein	5.41
<b><i>alr8034</i></b> ; <i>tral</i> ; Similar to mobilization protein	-39.05
<b><i>alr8509</i></b> ; Similar to mobilization protein	-38.31
<b><i>asl2329</i></b> ; <i>gifA</i>	3.56

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>b</sup> El resultado de la validación de los genes seleccionados por ensayos de EMSA se indica como +/- . Los genes descritos previamente como dianas de FurC en (Yingping et al., 2014) y Capítulo 2 de esta Tesis doctoral se muestran con el símbolo (+)

Tabla suplementaria S4. Genes que codifican proteínas hipotéticas o desconocidas cuya expresión está alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) en comparación con *Anabaena* sp. PCC7120.

Gene	Fold change
<i>all0143</i>	-4.17
<i>all0144</i>	-6.92
<i>all0291</i>	4.20
<i>all0424</i>	2.91
<i>all0497</i>	3.13
<i>all0591</i>	2.88
<i>all0592</i>	3.59
<i>all0615</i>	4.02
<i>all0634</i>	3.12
<i>all0684</i>	-2.91
<i>all0772</i>	-3.50
<i>all0777</i>	-3.42
<i>all1193</i>	3.26
<i>all1797</i>	2.89
<i>all1969</i>	-4.55
<i>all1970</i>	-16.55
<i>all1973</i>	-194.76
<i>all1974</i>	-120.27
<i>all1975</i>	-120.27
<i>all2032</i>	3.89
<i>all2128</i>	5.90
<i>all2965</i>	3.91
<i>all3310</i>	2.88
<i>all4364</i>	3.83
<i>all4414</i>	-3.15
<i>all4690</i>	3.12
<i>all4843</i>	-2.97
<i>all5213</i>	6.13
<i>all5311</i>	3.21
<i>all7011</i>	650.00
<i>all7013</i>	41.65
<i>all7309</i>	650.00
<i>all7313</i>	64.13
<i>all7316</i>	650.00
<i>all7317</i>	650.00
<i>all7319</i>	35.39
<i>all7320</i>	650.00
<i>all7347</i>	650.00
<i>all7351</i>	-10.47
<i>all7355</i>	-11.07
<i>all7364</i>	-14.52
<i>all7368</i>	-14.52
<i>all7370</i>	-14.52
<i>all7373</i>	-155.98
<i>all7379</i>	-10.67
<i>all8503</i>	650.00

<i>all8519</i>	-111.85
<i>all8520</i>	-111.85
<i>all8547</i>	650.00
<i>all8548</i>	650.00
<i>all9002</i>	-103.14
<i>all9003</i>	-103.14
<i>all9023</i>	650.00
<i>alr0227</i>	2.93
<i>alr0369</i>	4.06
<i>alr0549</i>	3.17
<i>alr0554</i>	7.33
<i>alr0892</i>	3.25
<i>alr0894</i>	3.32
<i>alr1190</i>	6.42
<i>alr1329</i>	2.91
<i>alr1561</i>	3.71
<i>alr1562</i>	3.26
<i>alr1655</i>	2.86
<i>alr1752</i>	-2.87
<i>alr1810</i>	3.93
<i>alr1819</i>	3.30
<i>alr1977</i>	-9.36
<i>alr2141</i>	13.44
<i>alr2935</i>	3.03
<i>alr3364</i>	9.79
<i>alr3811</i>	-3.05
<i>alr4027</i>	10.87
<i>alr4059</i>	4.29
<i>alr4061</i>	2.83
<i>alr4062</i>	4.26
<i>alr4158</i>	2.90
<i>alr4685</i>	3.20
<i>alr4917</i>	-41.88
<i>alr4919</i>	-26.09
<i>alr4922</i>	-6.34
<i>alr5208</i>	4.15
<i>alr5212</i>	3.87
<i>alr7007</i>	650.00
<i>alr7019</i>	22.16
<i>alr7318</i>	114.80
<i>alr7326</i>	28.52
<i>alr7345</i>	9.52
<i>alr7346</i>	650.00
<i>alr7352</i>	-3.50
<i>alr7357</i>	-10.78
<i>alr7358</i>	-9.03
<i>alr7378</i>	-11.84
<i>alr7384</i>	-12.93
<i>alr8033</i>	-15.74
<i>alr8555</i>	650.00
<i>alr9005</i>	-49.60

<i>alr9010</i>	-49.60
<i>alr9011</i>	-49.60
<i>alr9012</i>	-49.60
<i>asl0046</i>	5.67
<i>asl0163</i>	2.96
<i>asl0206</i>	3.60
<i>asl1412</i>	2.86
<i>asl2024</i>	19.54
<i>asl2332</i>	3.56
<i>asl3517</i>	4.66
<i>asl7365</i>	-14.52
<i>asl8514</i>	-111.85
<i>asl8515</i>	-111.85
<i>asl8521</i>	-111.85
<i>asr0460</i>	8.31
<i>asr0461</i>	8.31
<i>asr0773</i>	2.92
<i>asr0925</i>	3.20
<i>asr1134</i>	3.22
<i>asr1558</i>	3.59
<i>asr4920</i>	-5.86
<i>asr7023</i>	650.00
<i>asr7363</i>	-8.89
<i>asr9007</i>	-49.60
<i>asr9008</i>	-49.60

Tabla suplementaria S5. Genes que codifican proteínas hipotéticas o desconocidas cuya expresión está alterada en la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto *Anabaena sp.* PCC7120 tras 48 h en deficiencia de nitrógeno (BG11<sub>0</sub>)

Gene	Fold change
<i>all0143</i>	-5.52
<i>all0263</i>	3.17
<i>all0291</i>	6.21
<i>all0313</i>	3.81
<i>all0403</i>	-3.93
<i>all0419</i>	3.08
<i>all0424</i>	3.07
<i>all0458</i>	4.60
<i>all0479</i>	3.05
<i>all0634</i>	3.04
<i>all0726</i>	2.92
<i>all0777</i>	-4.96
<i>all0935</i>	5.18
<i>all1091</i>	3.62
<i>all1179</i>	3.44
<i>all1193</i>	16.25
<i>all1251</i>	4.43
<i>all1253</i>	6.14
<i>all1273</i>	3.11
<i>all1427</i>	-3.29
<i>all1471</i>	3.20
<i>all1508</i>	3.72
<i>all1511</i>	4.18
<i>all1644</i>	4.96
<i>all1672</i>	4.78
<i>all1754</i>	3.14
<i>all1755</i>	15.49
<i>all1771</i>	2.97
<i>all1782</i>	3.82
<i>all1783</i>	4.67
<i>all1841</i>	3.13
<i>all1969</i>	-9.94
<i>all1970</i>	-33.64
<i>all1973</i>	-200.02
<i>all1974</i>	-146.29
<i>all1975</i>	-146.29
<i>all2031</i>	3.03
<i>all2032</i>	7.83
<i>all2034</i>	3.48
<i>all2038</i>	2.98
<i>all2059</i>	2.95
<i>all2086</i>	3.25
<i>all2126</i>	82.83
<i>all2127</i>	82.83
<i>all2128</i>	94.82
<i>all2134</i>	3.30

<b><i>all2163</i></b>	4.40
<b><i>all2238</i></b>	3.04
<b><i>all2293</i></b>	3.51
<b><i>all2652</i></b>	-3.01
<b><i>all2685</i></b>	3.26
<b><i>all2740</i></b>	-4.09
<b><i>all2792</i></b>	5.02
<b><i>all2796</i></b>	2.88
<b><i>all2868</i></b>	2.98
<b><i>all2869</i></b>	4.94
<b><i>all2965</i></b>	224.64
<b><i>all3149</i></b>	3.09
<b><i>all3173</i></b>	4.73
<b><i>all3186</i></b>	2.97
<b><i>all3310</i></b>	4.24
<b><i>all3313</i></b>	2.90
<b><i>all3346</i></b>	4.69
<b><i>all3433</i></b>	25.46
<b><i>all3447</i></b>	4.63
<b><i>all3488</i></b>	3.92
<b><i>all3719</i></b>	3.15
<b><i>all3779</i></b>	3.36
<b><i>all3781</i></b>	3.91
<b><i>all3792</i></b>	2.93
<b><i>all4049</i></b>	2.98
<b><i>all4050</i></b>	3.09
<b><i>all4233</i></b>	3.00
<b><i>all4254</i></b>	3.46
<b><i>all4260</i></b>	3.54
<b><i>all4297</i></b>	3.90
<b><i>all4300</i></b>	3.33
<b><i>all4315</i></b>	3.22
<b><i>all4364</i></b>	3.37
<b><i>all4418</i></b>	3.80
<b><i>all4423</i></b>	3.28
<b><i>all4425</i></b>	3.47
<b><i>all4428</i></b>	4.25
<b><i>all4440</i></b>	3.40
<b><i>all4445</i></b>	33.33
<b><i>all4460</i></b>	6.71
<b><i>all4690</i></b>	3.65
<b><i>all4916</i></b>	-4.26
<b><i>all4940</i></b>	-2.83
<b><i>all4980</i></b>	3.10
<b><i>all5040</i></b>	5.06
<b><i>all5213</i></b>	4.86
<b><i>all5221</i></b>	6.36
<b><i>all5241</i></b>	2.94
<b><i>all5247</i></b>	15.33
<b><i>all5281</i></b>	10.84
<b><i>all5311</i></b>	4.36

<b><i>all7011</i></b>	24.35
<b><i>all7012</i></b>	28.42
<b><i>all7013</i></b>	18.67
<b><i>all7309</i></b>	650.00
<b><i>all7316</i></b>	650.00
<b><i>all7319</i></b>	23.90
<b><i>all7320</i></b>	650.00
<b><i>all7331</i></b>	14.89
<b><i>all7351</i></b>	-4.77
<b><i>all7355</i></b>	-8.20
<b><i>all7379</i></b>	-8.75
<b><i>all8507</i></b>	-32.45
<b><i>all8508</i></b>	-32.45
<b><i>all8519</i></b>	-175.56
<b><i>all8520</i></b>	-175.56
<b><i>all8547</i></b>	650.00
<b><i>all8548</i></b>	650.00
<b><i>all8553</i></b>	650.00
<b><i>all9002</i></b>	-107.91
<b><i>all9003</i></b>	-107.91
<b><i>all9023</i></b>	650.00
<b><i>all9030</i></b>	650.00
<b><i>all9031</i></b>	650.00
<b><i>alr0149</i></b>	3.11
<b><i>alr0150</i></b>	4.07
<b><i>alr0162</i></b>	4.24
<b><i>alr0201</i></b>	5.39
<b><i>alr0255</i></b>	4.05
<b><i>alr0402</i></b>	-6.98
<b><i>alr0436</i></b>	3.48
<b><i>alr0451</i></b>	4.08
<b><i>alr0452</i></b>	4.08
<b><i>alr0554</i></b>	6.28
<b><i>alr0566</i></b>	23.23
<b><i>alr0568</i></b>	6.97
<b><i>alr0668</i></b>	4.43
<b><i>alr0685</i></b>	-6.52
<b><i>alr0739</i></b>	6.79
<b><i>alr0740</i></b>	4.53
<b><i>alr0803</i></b>	3.40
<b><i>alr0804</i></b>	3.09
<b><i>alr0892</i></b>	7.59
<b><i>alr1028</i></b>	3.60
<b><i>alr1029</i></b>	3.65
<b><i>alr1030</i></b>	3.65
<b><i>alr1056</i></b>	3.62
<b><i>alr1083</i></b>	3.23
<b><i>alr1146</i></b>	2.89
<b><i>alr1147</i></b>	3.19
<b><i>alr1148</i></b>	3.09
<b><i>alr1183</i></b>	6.19

<i>alr1190</i>	30.43
<i>alr1329</i>	6.45
<i>alr1330</i>	19.65
<i>alr1347</i>	-3.21
<i>alr1401</i>	3.44
<i>alr1460</i>	3.16
<i>alr1534</i>	3.72
<i>alr1561</i>	4.83
<i>alr1562</i>	5.80
<i>alr1563</i>	5.29
<i>alr1564</i>	5.29
<i>alr1577</i>	5.12
<i>alr1652</i>	5.03
<i>alr1653</i>	2.96
<i>alr1654</i>	3.79
<i>alr1655</i>	4.33
<i>alr1810</i>	3.44
<i>alr1868</i>	2.95
<i>alr1920</i>	3.12
<i>alr1977</i>	-9.85
<i>alr2117</i>	4.11
<i>alr2140</i>	3.05
<i>alr2203</i>	3.02
<i>alr2256</i>	4.29
<i>alr2257</i>	4.74
<i>alr2407</i>	2.86
<i>alr2426</i>	3.03
<i>alr2464</i>	3.10
<i>alr2662</i>	-11.25
<i>alr2790</i>	12.23
<i>alr2814</i>	2.91
<i>alr2856</i>	3.08
<i>alr2935</i>	3.33
<i>alr2947</i>	15.71
<i>alr2974</i>	3.07
<i>alr2979</i>	3.26
<i>alr3015</i>	3.11
<i>alr3091</i>	2.93
<i>alr3150</i>	2.83
<i>alr3238</i>	4.17
<i>alr3301</i>	8.42
<i>alr3302</i>	8.13
<i>alr3303</i>	8.13
<i>alr3304</i>	3.59
<i>alr3365</i>	3.71
<i>alr3366</i>	3.59
<i>alr3437</i>	3.15
<i>alr3471</i>	2.92
<i>alr3472</i>	3.31
<i>alr3504</i>	3.78
<i>alr3533</i>	3.35

<i>alr3554</i>	10.73
<i>alr3588</i>	3.59
<i>alr3591</i>	3.88
<i>alr3729</i>	3.76
<i>alr3730</i>	3.05
<i>alr3801</i>	7.88
<i>alr3817</i>	4.82
<i>alr3890</i>	3.11
<i>alr4059</i>	5.96
<i>alr4061</i>	3.90
<i>alr4062</i>	7.11
<i>alr4504</i>	3.42
<i>alr4505</i>	3.89
<i>alr4525</i>	3.85
<i>alr4529</i>	2.95
<i>alr4611</i>	3.63
<i>alr4649</i>	3.14
<i>alr4685</i>	5.15
<i>alr4783</i>	3.52
<i>alr4821</i>	10.01
<i>alr4917</i>	-87.36
<i>alr4919</i>	-17.91
<i>alr4921</i>	-4.19
<i>alr4922</i>	-7.62
<i>alr4939</i>	-5.89
<i>alr4965</i>	3.08
<i>alr5067</i>	-4.18
<i>alr5212</i>	7.16
<i>alr5214</i>	2.86
<i>alr5225</i>	9.62
<i>alr5226</i>	4.18
<i>alr5229</i>	6.87
<i>alr5230</i>	5.58
<i>alr5231</i>	9.42
<i>alr5232</i>	6.31
<i>alr5233</i>	5.78
<i>alr5234</i>	3.83
<i>alr5236</i>	4.05
<i>alr5239</i>	3.06
<i>alr5243</i>	3.34
<i>alr7007</i>	650.00
<i>alr7019</i>	22.15
<i>alr7318</i>	80.22
<i>alr7326</i>	41.80
<i>alr7336</i>	650.00
<i>alr7345</i>	6.01
<i>alr7357</i>	-11.09
<i>alr7358</i>	-6.94
<i>alr7358</i>	41.18
<i>alr7378</i>	-11.90
<i>alr7383</i>	-17.75

<i>alr7384</i>	-20.39
<i>alr7503</i>	-3.27
<i>alr7504</i>	-3.27
<i>alr8033</i>	-39.05
<i>alr8061</i>	-6.33
<i>alr8529</i>	-21.70
<i>alr8555</i>	650.00
<i>alr9005</i>	-18.59
<i>alr9010</i>	-18.59
<i>alr9011</i>	-18.59
<i>alr9012</i>	-18.59
<i>asl0026</i>	7.83
<i>asl0046</i>	6.94
<i>asl1111</i>	3.90
<i>asl1218</i>	2.83
<i>asl1274</i>	3.11
<i>asl1664</i>	4.55
<i>asl2024</i>	20.93
<i>asl2028</i>	4.77
<i>asl2052</i>	3.21
<i>asl2403</i>	3.55
<i>asl2686</i>	3.26
<i>asl3470</i>	3.49
<i>asl3501</i>	3.55
<i>asl3709</i>	4.05
<i>asl4328</i>	4.09
<i>asl4561</i>	3.57
<i>asl4562</i>	3.57
<i>asl8514</i>	-175.56
<i>asl8515</i>	-175.56
<i>asl8521</i>	-175.56
<i>asr0148</i>	3.11
<i>asr0460</i>	3.52
<i>asr0461</i>	3.52
<i>asr0925</i>	6.35
<i>asr1134</i>	4.46
<i>asr1558</i>	6.74
<i>asr1559</i>	3.41
<i>asr1667</i>	3.93
<i>asr3886</i>	3.07
<i>asr4302</i>	2.89
<i>asr4470</i>	3.59
<i>asr4471</i>	3.59
<i>asr5146</i>	5.05
<i>asr9007</i>	-18.59
<i>asr9008</i>	-18.59

**Tabla suplementaria S6. Secuencias putativas de unión de FurC encontradas en las regiones promotoras del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante búsqueda con la herramienta FIMO.**

<i>ORF</i>	<i>Gen/rol<sup>a</sup></i>	<i>p-value</i>	Secuencia putativa de unión de FurC	Distancia hasta ATG
<b><i>alr4641</i></b>	<b><i>prxA</i></b>	1.18x10 <sup>-10</sup>	CATAGTCATAACGATTTTG	-208
<b><i>all4776</i></b>	<b><i>ftsH</i></b>	1.79x10 <sup>-10</sup>	CGAAGTCATTACGAATTTG	-171
<b><i>asl4146</i></b>	<b><i>srxA</i></b>	5.89x10 <sup>-10</sup>	CGAAGTCATAATGACTATG	-52
<b><i>all1541</i></b>	<b><i>ahpC</i></b>	2.81x10 <sup>-9</sup>	CGTAGTCATTATGATTATA	-52
<i>alr5164</i>	<i>degQ</i>	4.17x10 <sup>-9</sup>	CGTAGTCATTATGAATTTA	9
<b><i>alr0957</i></b>	<b><i>furC</i></b>	9.55x10 <sup>-9</sup>	CAAACCTCATTACAACCTTA	-191
<b><i>alr0874</i></b>	<b><i>nifH2</i></b>	1.48x10 <sup>-8</sup>	AAAAATCATAACGATATTG	-900
<i>all0473</i>	<i>zupT</i> ; zinc transporter	2.19x10 <sup>-7</sup>	CATAGTCATTTCAACTATG	-34
<i>all0879</i>	zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	9.22x10 <sup>-7</sup>	AATACTAATTACAACCTTTG	-71
<i>alr0359</i>	hypothetical protein	3.25x10 <sup>-7</sup>	CAAAATCATAATGATATAG	-144
<i>alr0760</i>	hypothetical protein	1.39x10 <sup>-6</sup>	CACAGTCATAACGACATAG	9
<i>alr1604</i>	hypothetical protein	2.26x10 <sup>-6</sup>	CGTAATTATTACTATTTTG	-52
<i>all5305</i>	hypothetical protein	2.39x10 <sup>-6</sup>	CCTAATCATTATGTTTTTG	9
<i>all2761</i>	hypothetical protein	2.94x10 <sup>-6</sup>	AGAAATCTTAATAATAATG	9
<i>alr1794</i>	hypothetical protein	3.06x10 <sup>-6</sup>	CGTACTCATTACTCCTATG	3
<i>all0465</i>	hypothetical protein	3.10x10 <sup>-6</sup>	CAAAATTATAGTGACTTTG	-90
<i>alr4559</i>	hypothetical protein	3.36x10 <sup>-6</sup>	CTTACTCATTATTATTATG	-169
<i>asr7140</i>	hypothetical protein	3.91x10 <sup>-6</sup>	AAAAATCATAAACATTTTG	-49
<i>asl0095</i>	hypothetical protein	4.18x10 <sup>-6</sup>	CAAATACATAATGAAATTG	-7
<i>alr0309</i>	hypothetical protein	5.79x10 <sup>-6</sup>	ATAACTCATAATAAAAATA	-44
<i>all0158</i>	hypothetical protein	5.96x10 <sup>-6</sup>	AATAATAATTACGATTTTT	-121
<i>all1426</i>	hypothetical protein	7.56x10 <sup>-6</sup>	AAAAGTCATTTCAATTTGA	91
<i>all2038</i>	hypothetical protein	8.38x10 <sup>-6</sup>	CGTACTAATTAATAATTTG	-9
<i>all0839</i>	hypothetical protein	9.26x10 <sup>-6</sup>	CATACTTAGAATAATTTTG	-57
<i>all3292</i>	hypothetical protein	9.60x10 <sup>-6</sup>	AGTAATCTTTATTACTTTG	-129
<i>all2040</i>	hypothetical protein	1.07x10 <sup>-6</sup>	CGTAATCATAACAATATAA	-185
<i>alr4334</i>	<i>pheA2</i> ; prephenate dehydratase	1.64x10 <sup>-6</sup>	CAATGTCATTATGTTTTTA	9
<i>all1123</i>	orange Carotenoid Protein NTD-homolog	1.76x10 <sup>-6</sup>	CGCAATCATTATGACTTTT	9
<i>all1272</i>	<i>glgP1</i> ; glycogen phosphorylase	1.85x10 <sup>-6</sup>	CAAAGTCATGGCAATTTTA	-81
<i>all4018</i>	<i>opcA</i> ; glucosa-6-phosphate dehydrogenase assembly protein	2.04x10 <sup>-6</sup>	GGAAGTCATAATAATTGTG	9
<i>alr3281</i>	putative transcriptional regulator	2.11x10 <sup>-6</sup>	AGTAGTCATACTAACATTA	9
<i>all5346</i>	<i>hgdC</i> ; heterocyst specific ABC-transporter	2.53x10 <sup>-6</sup>	AAAATTCATATTGATTTTG	9

<i>alr2137</i>	two-component system, NarL family, sensor kinase	3.25x10 <sup>-6</sup>	CGTAATGTTTACGATTATG	-134
<i>alr4124</i>	S-adenosylmethionine synthetase	3.50x10 <sup>-6</sup>	TGAAATCATAACAATCTTG	-191
<i>all4441</i>	glycosyltransferase family 2 protein	3.85x10 <sup>-6</sup>	ATTACTCATAACGACTTTC	9
<b><i>alr2834 hepC</i></b>		5.16x10 <sup>-6</sup>	CTTAATCATGACAACCTTA	-610
<i>alr0252</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	5.42x10 <sup>-6</sup>	AAAATCATAACGATTCAA	-189
<i>all0862</i>	<i>cmpR</i> ; LysR family transcriptional regulator, low CO <sub>2</sub> -responsive transcriptional regulator	5.53x10 <sup>-6</sup>	CATACTTATAACGAGAATG	-191
<i>all0067</i>	cob(I)alamin adenosyltransferase	5.83x10 <sup>-6</sup>	CAAAATCAAATTGATTATA	-68
<i>alr3809</i>	<i>carB</i> ; carbamoyl phosphate synthase	6.33x10 <sup>-6</sup>	AAAAGTCAAATGATCATA	-128
<i>asr2369</i>	hypothetical protein	6.33x10 <sup>-6</sup>	AAAAGTCTTAACGAAAGTG	-124
<i>asr3992</i>	<i>psbZ</i> ; controls the interaction of photosystem II cores with light-harvesting antenna	6.42x10 <sup>-6</sup>	AGAAGTCAAATGACCATA	9
<i>alr2339</i>	<i>hetR</i>	6.85x10 <sup>-6</sup>	AGTAGTCATAATGGCTTAA	-838
<i>all3797</i>	<i>fas1</i>	7.05x10 <sup>-6</sup>	AAATCTCATAACTAATTTG	-116
<i>all3578</i>	DNA polymerase subunit III DNAeNI	8.25x10 <sup>-6</sup>	TGTAATCACTATGAATATG	37
<i>all0945</i>	<i>sdhB</i> ; succinate dehydrogenase iron-sulfur protein subunit	8.25x10 <sup>-6</sup>	CATAACCATTAATAATTTTA	-155
<i>alr4548</i>	<i>psbD</i> ; photosystem II D2 protein	8.79x10 <sup>-6</sup>	CGAACTTATAAAAACATTG	-13
<i>alr2325</i>	<i>ancrpB</i> ; cAMP receptor protein transcriptional regulator	8.89x10 <sup>-6</sup>	ATAAGTAATAATAACTATG	-170
<i>alr2822</i>	hep island protein	9.90x10 <sup>-6</sup>	CAAAATCTTTAAAAATTTA	-286

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

Se muestran en negrita los genes descritos previamente como diana en (Yingping et al., 2014) y en este trabajo.

**Tabla suplementaria S6. Lista de proteínas con abundancia relativa en el exoproteoma de la estirpe de sobreexpresión de *furC* (EB2770FurC) con respecto al de *Anabaena* sp. PCC7120.**

ORF	Proteína/Descripción <sup>a</sup>	Log2 ( <i>fold change</i> )	Identificada previamente <sup>b</sup>	Predicción localización	Péptido señal	RNA-seq <sup>d</sup>
<b>Fotosíntesis y respiración</b>						
<i>PSI</i>						
All0329	PsaD; PSI reaction center subunit II	2.227		CM		
Asr4319	PsaE; Photosystem I reaction center subunit IV	3.206		CM		
<i>PSII</i>						
Alr1216	PsbU; PSII 12 kDa extrinsic protein	4.839		CM	Y	
All0259	PsbV; Cytochrome c-550	2.953	(1)	CM	Y	
All0801	Psb28; Photosystem II reaction center Psb28 protein	2.05		CM		
All3854	PsbO; photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1	3.502		U*	Y	(b)
All3076	PsbP; photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2	4.327		U		
<i>Ficobilisoma</i>						
Alr0534	CpcG1; Phycobilisome rod-core linker polypeptide	3.609	(1)	CM		
Alr0021	ApcA1; Allophycocyanin subunit alpha 1	3.284	(1,2)	U		(b)
Alr0523	PecB; Phycoerythrocyanin subunit beta	3.54	(1)	U		(b)
All3653	ApcD; Allophycocyanin subunit alpha-B	2.977	(1)	C		
All5339	CpcT1; Phycocyanobilin lyase	3.87		C		
Alr0022	ApcB; Allophycocyanin subunit beta	3.949	(1,2)	U		(b)
Alr0528	CpcB; C-phycocyanin beta subunit	3.568	(1,2)	U		(b)
Alr0535	CpcG2; Phycobilisome rod-core linker polypeptide	2.875		CM		
Alr0524	PecA; Phycoerythrocyanin alpha chain	1.321		U		(b)
Alr0530	CpcC; Phycobilisome 32.1 kDa linker polypeptide	2.862	(1)	CM		(b)
<i>Otros componentes</i>						
Alr4251	PetJ; Cytochrome c6	3.15		P	Y	
All4121	PetH; ferredoxin--NADP(+) reductase	4.15	(1,2)	CM		

All0258	PetE; Plastocyanin	-2.289		P	Y
All5039	AtpD; ATP synthase subunit beta	5.728	(1,2)	C*	Y
All0007	AtpF; ATP synthase subunit b	4.404		U	
All3570	Ppa; Inorganic pyrophosphatase	2.288	(2)	C	
<b>Metabolismo central del carbono</b>					
Alr1526	CbbS; Ribulose biphosphate carboxylase small subunit	4.118		U	
Alr1524	CbbL; Ribulose biphosphate carboxylase large chain	4.438	(1)	U	
All0865	CcmM; carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM	3.135		C #	
All0865	CcmK; Carbon dioxide concentrating mechanism protein	2.903		C #	
All5062	Gap2; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.502	(1)	C	
All3964	putative phosphoglucomutase/phosphomannomutase	2.279	(1,2)	C	
All4131	Pgk; Phosphoglycerate kinase	-2.625	(1,2)	C #	(b)
Alr1602	Pgl; glucose-6-P-dehydrogenase	2.14		C	
All4563	Fda; Fructose-biphosphate aldolase	2.825	(1)	U	
All3538	Eno; enolase	-2.582	(1,2)	C #	Y
<b>Metabolismo de hierro</b>					
Alr0397	schT; iron complex outer membrane receptor protein	2.238		OM	Y
All4026	lacT	2.592		OM	(a)
Alr2405	IsiB; Flavodoxin	3.933	(2)	U	
<b>Metabolismo de nitrógeno y diferenciación de heterocistos</b>					
All2319	Pll; Nitrogen regulatory protein	3.544			
All1940	Abp2	-1.93		U	Y
All1939	Abp1	-1.777		U	Y
<b>Respuesta a estrés oxidativo</b>					
All1173	starvation-inducible DNA-binding protein	4.309	(1,2)	C	
All3797	Fas1	1.62	(2)	U*	
All2375	CGT3; thioredoxin-dependent peroxiredoxin	2.318	(1)	U	
All2367	TrxA3; thioreoxin	2.003		C	
All4145	starvation-inducible DNA-binding protein	2.784	(1)	C	

Alr0672	similar to vanadium chloroperoxidase	2.936		U	(b)
Alr0052	TrxA1; thioredoxin	2.954		C	
Alr4641	PrxA; peroxirredoxin A	4.966	(1,2)	C #	(a)
Alr3090	CatB; Mn catalase	2.197	(1,2)	C	
Alr2938	SodB; Superoxide dismutase [Fe]	1.631	(1,2)	P	
<b>Pared celular</b>					
Alr0834	OprB-I; major outer membrane protein	-1.46	(1)	OM-S-I	
Alr0093	AmiC2; N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-2.245		OM	Y
Alr2269	Omp85; outer membrane protein insertion porin family	-1.746		OM	Y
Alr0092	AmiC1; N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-1.822		U*	Y
Alr4067	LptA; lipopolysaccharide export system protein LptA	-2.567		U	Y
Alr2479	polyisoprenyl-teichoic acid--peptidoglycan teichoic acid transferase	1.69		CM	Y
Alr2887	HgdD; heterocyst glycolipid deposition protein	-2.545	(1)	OM	
Alr4550	OprB-like porin	-1.607	(1,2)	OM-S-I	Y
All4499	OprB-like porin	-1.739	(1)	OM-S-I	Y
<b>Transporte a través de membrana</b>					
All2358	Phosphonate ABC transport phosphonate binding component	-1.93		P	Y
All1027	putative chitobiose transport system substrate-binding protein	2.925		CM	Y
Alr5361	basic membrane protein A and related proteins	1.052		U	
All4130	polar amino acid transport system substrate-binding protein	-3.417		P	Y
All4575	PstS1; phosphate transport system substrate-binding protein	2.047	(1)	P	Y
All0495	polysaccharide biosynthesis/export protein	-1.826		U	Y
<b>Degradación de péptidos y proteínas</b>					
Alr0880	oligopeptidase A	1.484	(1)	C	
All2008	DegQ homolog serin proteinase	1.488		P	Y
<b>Funciones reguladoras</b>					
All1919	serine/threonine kinase	2.406		P	
All3660	two-component response regulator	1.785		C	

**Metabolismo de aminoácidos**

Alr4054	MtnP; S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS	3.963		C		
Alr4416	cystathionine beta-synthase	2.145		C		
Alr2771	IlvD	1.651	(1,2)	C		
Alr4552	cysteine synthase	2.688		C		
All3569	PanD; Aspartate 1-decarboxylase	1.347		C		
Alr3338	phosphoglycerate mutase	1.633		C		
Alr4853	aspartate aminotransferase	-2.013	(1)	C		
All2436	AspS; Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	1.039	(2)	C		
Alr2051	gamma-glutamyltranspeptidase / glutathione hydrolase	-2.441		U*	Y	(b)
All4608	GcvH; Glycine cleavage system H protein	2.159		C		

**Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos**

All0218	PdxJ; Pyridoxine 5'-phosphate synthase	3.485		C		
All2347	MenB; 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase	1.621		C		(a)
Alr3512	7,8-dihydroneopterin aldolase/epimerase/oxygenase	1.822		U		
Alr1241	UbiX; Flavin prenyltransferase	2.513	(1,2)	C		(a)
Alr3242	HutA2; heme transport protein	1.39		OM		
Alr4380	porphobilinogen synthase	2.646		C #		
Alr3883	IspF; 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	2.001		C		
Asr4549	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase	1.414		C		
Alr0051	IMP dehydrogenase	1.79	(1)	C		

**Chaperonas**

Alr3662	GroL1; 60 kDa chaperonin 1	4.257		C		
Alr1896	GroL2; 60 kDa chaperonin 2	3.683		C		
Alr3661	GroES; 10 kDa chaperonin	4.24		C		

**Proteínas de reparación y recombinación del ADN**

All0441	DNA gyrase subunit A	2.762		C		
All3272	RecA	3.292		C		

**Metabolismo de nucleótidos**

Alr2742	PurK; N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	1.52		CM		
---------	--	------	--	----	--	--

All3093	PurH; Bifunctional purine biosynthesis protein	1.026		C	
<b>Traducción</b>					
Alr5303	RplL; 50S ribosomal protein L7/L12	3.874		U*	(b)
Alr1208	Frr; Ribosome-recycling factor	3.681		C	
All0579	RplI; 50S ribosomal protein L9	4.246		C	
Alr5301	RplA; 50S ribosomal protein L1	2.596		C	
All4193	RpsM; 30S ribosomal protein S13	2.891		C	
Alr0335	ThrS; Threonine--tRNA ligase	2.572			
All4802	RpsF; 30S ribosomal protein S6	2.039		C	
Asr3168	30S ribosomal protein 3	3.535		U	
All4792	RpsB; 30S ribosomal protein S2	4.262		C	
All4336	RpsJ; 30S ribosomal protein S10	1.444		C	
All3184	IrtA; Ribosome hibernation promoting factor	3.524			
All4337	TufA; Elongation factor Tu	2.269		C	Y
All4338	FusA; Elongation factor G OS	2.403		C	
<b>Proteínas de unión a RNA</b>					
Asl4022	RbpD	4.069		U	
All4377	RNA-binding protein	2.739		C	
All2777	RbpE; Putative RNA-binding protein	2.436		U	
Alr2311	RbpF; Putative RNA-binding protein	2.081		U	
<b>Otros</b>					
All1723	probable aldolase	2.66		C	
All3532	L-Ala-D/L-Glu epimerase	2.086		C	
Alr7243	similar to ankyrin	-3.231		U	
All1864	similar to NADH dehydrogenase	2.029		C	
Alr7169	L-amino acid oxidase	-3.343		C	
Alr4448	endo-1,4-beta-xylanase	1.768	(1)	U*	
Alr3608	similar to endoglucanase	-1.991	(1)	U* S-I	Y
Alr1362	carboxymethylenebutenolidase	1.715	(1)	U*	Y

All1750	similar to WD-repeat containing protein	1.415	(1)	U		(b)
<b>Proteínas hipotéticas o desconocidas</b>						
All4689	hypothetical protein	4.352		U	Y	
All0513	hypothetical protein	2.77		U		
All0186	hypothetical protein	2.657		U	Y	
All1193	hypothetical protein	6.554		U	Y	(a,b)
Alr3863	hypothetical protein	2.278		C		
All4782	unknown protein	3.502		U		
Asl4482	hypothetical protein	3.816		U		
Alr3715	unknown protein	3.797		U	Y	
Alr1460	hypothetical protein	2.841		C		(b)
All5274	hypothetical protein	2.19		CM	Y	
All4038	unknown protein	3.241	(1)	U	Y	
Alr1520	hypothetical protein	1.237	(1)	U	Y	
Alr0946	hypothetical protein	3.106		C		
All0216	hypothetical protein	3.493		U		
Alr3445	hypothetical protein	1.309		U		
All4295	hypothetical protein	3.387		CM	Y	
Alr4132	hypothetical protein	2.705		U		
All0767	hypothetical protein	2.707		CM		
Alr1537	hypothetical protein	4.01		C		
Asr1156	hypothetical protein	3.983		U		
Alr7345	hypothetical protein	-4.418		CM	Y	(a,b)
All1351	unknown protein	2.467		U		
Alr1144	unknown protein	2.465		U	Y	
All7614	hypothetical protein	-1.567	(1)	OM-S-I	Y	
Alr3377	unknown protein	2.413		CM	Y	
Alr0806	unknown protein	4.943		C		
All4050	hypothetical protein	2.001	(1,2)	C		(b)
All8040	unknown protein	4.843		U		

All2571	unknown protein	2.214		U	Y	
All3520	unknown protein	2.107		U		
Alr0359	unknown protein	2.756		U	Y	
Alr7503	unknown protein	4.025		U		(b)
All2050	hypothetical protein	-3.065		CM	Y	
Alr3932	unknown protein	-3.432		U	Y	
All0459	unknown protein	3.125		U	Y	
All2110	hypothetical protein	2.039		U		
All2116	hypothetical protein	-2.55		U	Y	
All4523	hypothetical protein	-1.772		U	Y	
Asr4959	hypothetical protein	2.029		U		
All0405	hypothetical protein	-3.062		U		
Alr4740	unknown protein	-2.275		U		
All7013	unknown protein	-2.009		U		(a,b)
All4869	hypothetical protein	-1.904		U	Y	
Alr2202	hypothetical protein	2.335		U	Y	
Alr4979	hypothetical protein	1.66	(1,2)	C		
Alr3548	hypothetical protein	3.272		CM	Y	
All7598	unknown protein	-2.401		U	Y	
All8079	unknown protein	2.997		OM		
Asr3544	unknown protein	1.513		U		
Asr1289	unknown protein	2.935		U		
All3580	unknown protein	2.548		U		
All8004	unknown protein	5.351		U		
Alr2060	hypothetical protein	3.982		U	Y	
Alr7233	unknown protein	-4.096		U	Y	
Alr3539	unknown protein	2.068	(1,2)	U		
Alr1819	hypothetical protein	-2.142		CM	Y	(a)
All2909	hypothetical protein	1.84		U	Y	
All3314	unknown protein	3.395		U*		

Alr0114	hypothetical protein	-1.449		U	Y	
All4343	hypothetical protein	-3.042		CM	Y	
All2438	hypothetical protein	1.629		C		
Alr0474	unknown protein	-3.222	(1)	U		
Alr4741	hypothetical protein	-1.323		OM-S-I	Y	
All7611	unknown protein	-2.893		U	Y	
All3179	hypothetical protein	1.656		CM	Y	
All3541	unknown protein	2.356		U	Y	
All5018	unknown protein	3.256		C		
All7597	hypothetical protein	-3.182		U	Y	
All0351	hypothetical protein	1.267		U		
All2314	unknown protein	-2.925		U	Y	
Asr1134	hypothetical protein	4.383		U		(a,b)
All2080	hypothetical protein	1.19		C		
Alr3345	hypothetical protein	-2.363		U		
Alr2947	unknown protein	1.365		U	Y	(b)
Alr2117	unknown protein	-2.984		OM	Y	(b)
All1783	hypothetical protein	-2.523		U		(b)
Alr4783	hypothetical protein	1.958		CM		(b)
All5013	unknown protein	1.728		C		
Alr3917	unknown protein	-2.548		U	Y	
All3332	hypothetical protein	2.918		E	Y	
All2736	hypothetical protein	-1.532		U	Y	
All1814	unknown protein	1.487		U		
Alr7502	hypothetical protein	2.698		C		
All0268	hypothetical protein	-1.705	(1)	U		
All1342	unknown protein	-2.128	(1)	OM	Y	
All7607	unknown protein	-2.445		U*	Y	
Alr1143	unknown protein	4.545		C		
All7121	unknown protein	1.527		E	Y	

All0089	hypothetical protein	-1.278		P	
All7187	unknown protein	-1.467		U	Y
Asr7037	unknown protein	2.032		U	
All3984	hypothetical protein	-2.038	(1)	U	Y
All2277	hypothetical protein	-2.035		C	

<sup>a</sup> La anotación funcional de las proteínas se realizó de acuerdo con las bases de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) y KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>b</sup> Proteínas previamente identificadas en el exoproteoma (1): (Oliveira et al. 2015) y/o secretoma (2): (Hahn et al. 2015) de *Anabaena* sp. PCC7120 o cepas derivadas.

<sup>c</sup> Localización celular predicha por PSORTb (<https://www.psort.org/psortb>). CM (Membrana celular), U (Desconocida), C (Citoplasma), P (Periplasma), OM (Membrana externa), S-I (Capa S de la membrana externa), E (Extracelular). El asterisco indica la posibilidad de que proteína puede encontrarse en varias localizaciones simultáneamente. El símbolo # indica las proteínas encontradas en la mayoría de exosomas según KEGG (<http://genome.jp/kegg>).

<sup>d</sup> Se indican las proteínas cuya expresión estaba alterada en el análisis de RNA-seq de la estirpe de sobreexpresión de FurC respecto a *Anabaena* sp. PCC7120 en condiciones normales (a) o en condiciones de deficiencia de nitrógeno (b).

## Anexo II: Publicaciones

Publicaciones derivadas de este trabajo:

**Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, Fillat MF.** (2019) Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell Physiol*, **60**, 1778-1789.

**Sarasa-Buisan C, Guío J, Broset E, Peleato M.L, Fillat M.F, Sevilla E.** (2022) FurC (PerR) from *Anabaena* sp. PCC7120: a versatile transcriptional regulator engaged in the regulatory network of heterocyst development and nitrogen fixation. *Environ Microbiol.* **24**, 566-582.

Sarasa-Buisan C, Guío J, Peleato ML, Fillat MF, Sevilla E. Expanding the FurC (PerR) regulon in *Anabaena* sp. PCC7120: involvement of FurC in the regulation of processes dependent of C/N ratio. *Front. Microbiol.* (En revisión)

Publicaciones adicionales y colaboraciones:

**Guío J, Sarasa-Buisan C, Velázquez-Campoy A, Bes M.T, Fillat M.F, Peleato M.L, Sevilla E.** (2020) 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the ntcA promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett*, **594**, 278-289.

**Sarasa-Buisán, C, Guío, J, Castro, C, Bes, M.T, Fillat, M.F, Peleato, M.L, Sevilla, E.** (2022) Contributions on Lindane Degradation by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Water*, **14**, 1219.

**González A, Casado J, Gündüz MG, Santos B, Velázquez-Campoy A, Sarasa-Buisan C, Fillat M.F, Montes M, Piazuelo E, Lanás A.** (2022) 1,4-Dihydropyridine as a Promising Scaffold for Novel Antimicrobials against *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.* (En prensa)