

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Trabajo Fin de Máster

***Estudio del papel de las cisteínas del regulador
transcripcional FurB de cianobacterias.***

“Role of cysteines in the transcriptional regulator FurB from cyanobacteria.”

Directores: Emma Sevilla Miguel y Andrés González Rodríguez.

Ponente: María F. Fillat Castejón.

Isabel Valero Rubira

Curso 2016/2017

ÍNDICE

Abreviaturas	1
1.- Resumen/ Abstract	2
2.- Introducción y Antecedentes	4
2.1.- Las cianobacterias	4
2.1.1.- Características generales	4
2.1.2.- <i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	4
2.2.- Metabolismo del hierro y del zinc en cianobacterias	5
2.2.1.- Importancia del hierro y el zinc	5
2.2.2.- Regulación del metabolismo de metales por proteínas de la familia FUR (<i>Ferric Uptake Regulator</i>)	6
2.3.- Proteínas de la familia FUR en <i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	7
2.3.1.- FurA	7
2.3.2.- FurB	8
2.3.3.- FurC	12
3.- Objetivos	14
4.- Materiales y Métodos	15
4.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	15
4.2.- Obtención de células competentes y transformación por choque térmico	15
4.2.1.- Generación de <i>E.coli</i> quimiocompetentes	15
4.2.2.- Transformación de cepas de <i>E.coli</i> con plásmidos mediante choque térmico	16
4.3.- Preparación de plásmidos liofilizados	16
4.4.- Sobreexpresión de las proteínas recombinantes	16
4.4.1.- Prueba de expresión	16
4.4.2.- Generación de biomasa e inducción	17
4.4.3.- Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE	18
4.5.- Purificación de las proteínas recombinantes	18
4.5.1.- Lisis celular	18
4.5.2.- Empaquetado y equilibrado de la columna IMAC (<i>Ion Metal Affinity Chromatography</i>)	18
4.5.3.- Purificación mediante IMAC-Zn ²⁺	19
4.5.4.- Precipitación con TCA (ácido tricarbóxico)	19
4.5.5.- Diálisis, cuantificación y concentración	20
4.6.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas recombinantes	20
4.6.1.- Determinación de la presencia de Zn ²⁺ por ICP-MS (<i>Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry</i>)	20
4.6.2.- Ensayos de retardo en gel (EMSA)	20
4.6.3.- Dicroísmo circular	21
4.6.4.- Ensayo de oligomerización	21
4.6.5.- Ensayo de unión al grupo hemo	22
4.7.- Obtención de DNA genómico de <i>Anabaena sp.</i> y promotores	22
4.7.1.- Extracción de DNA genómico de <i>Anabaena sp.</i>	22
4.7.2.- Amplificación de promotores mediante PCR	23
5.- Resultados	24

5.1.- Sobreexpresión de las proteínas recombinantes	24
5.2.- Purificación de las proteínas mutantes FurB C81A, C84A, C121A y C124A	25
5.3.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas mutantes	26
5.3.1- Determinación de la presencia de Zn ²⁺ por ICP	26
5.3.2- Determinación de la actividad biológica de las proteínas mutantes por EMSA	27
5.3.3- Determinación de la estructura secundaria de las proteínas mutantes por dicroísmo circular	28
5.3.4.- Estudios de oligomerización de las proteínas mutantes con DTT y H ₂ O ₂	29
5.3.5.- Ensayos de unión al grupo hemo	31
6.- Discusión	35
6.1.- Purificación de las proteínas mutantes	35
6.2.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas mutantes	35
6.2.1.- Contenido en zinc de las proteínas FurB mutantes	35
6.2.2.- Actividad biológica <i>in vitro</i> de las proteínas FurB mutantes	36
6.2.3.- Oligomerización de las proteínas FurB mutantes	37
6.2.4.- Unión de las proteínas FurB mutantes al grupo hemo	37
7.- Conclusiones/ Conclusions	39
8.- Bibliografía	41

ABREVIATURAS.

Abs	Absorbancia
Ala, A	Alanina
AMS	<i>4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid</i>
Cys, C	Cisteína
DO	Densidad óptica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DTNB	<i>5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (Ditiotreitol)
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (ensayo de retardo en gel)
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i> (Proteína reguladora de la captación de hierro)
g	Fuerza centrífuga relativa (gravedad)
h	Hora
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanometro
nM	Concentración nanomolar
O/N	<i>Overnight</i> (toda la noche)
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
Pro, P	Prolina
PSA	Persulfato amónico
p/v	Relación peso/volumen
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	Revolución por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
TCA	Ácido tricarboxílico
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamina
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
V	Voltio
Val	Valina
v/v	Relación volumen/volumen
WT	<i>Wild Type</i> (proteína silvestre)
X	Cualquier aminoácido distinto a cisteína
Zur	<i>Zinc Uptake Regulator</i>
ϵ	Coefficiente de extinción molar
$^{\circ}$ C	Grado centígrado
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro
μ M	Concentración micromolar

1.- RESUMEN.

Las proteínas FUR (*Ferric Uptake Regulator*) pertenecen a una superfamilia de reguladores transcripcionales metalodependientes. Estas proteínas tienen una amplia distribución en el mundo procariota y juegan un papel clave en la regulación de la homeostasis del hierro y, otros metales como son el zinc, el manganeso o el níquel. Además, también, intervienen en la regulación de otros procesos celulares como son la defensa frente a estrés oxidativo, el metabolismo del nitrógeno, la diferenciación a heterocistos (en cianobacterias) o la virulencia de algunos microorganismos patógenos.

En la cianobacteria *Anabaena sp.* PCC 7120 existen tres parálogos de la familia Fur: FurA encargada de la regulación y homeostasis del hierro; FurB o Zur responsable de la homeostasis del zinc y de la defensa frente al estrés oxidativo; FurC descrita, recientemente, como el regulador PerR de *Anabaena sp.* PCC 7120 implicado en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo.

Estudios previos de caracterización bioquímica de la proteína FurB/Zur han sugerido que los residuos de cisteína que forman parte de los motivos C-X-X-C (Cys81, Cys84, Cys121 y Cys124) estarían implicados en la coordinación de un átomo de zinc estructural. Por otra parte, estudios previos realizados en el grupo de investigación sugieren que en esta familia de proteínas los residuos de cisteína juegan un papel crucial en la actividad y como posibles sensores redox o de hemo en las mismas. Por ello, y dado que no se ha resuelto la estructura de esta proteína, el objetivo principal de este trabajo es aportar nueva información al respecto a través de la caracterización de proteínas mutantes en los residuos de cisteína mencionados.

Los resultados obtenidos sugieren que los residuos de cisteína 81 y 84 (pertenecientes al primer motivo C-X-X-C) tienen una mayor probabilidad de estar implicados en la coordinación del zinc estructural, mientras que, los residuos 121 y 124 (del segundo motivo C-X-X-C) estarían formando un puente disulfuro intracatenario esencial para mantener la estructura secundaria de la proteína. Además, la mutación de cualquiera de los cuatro residuos de cisteína provoca una pérdida de la actividad biológica de las proteínas *in vitro*, pero no altera la capacidad que tienen estas proteínas para unirse al grupo hemo.

ABSTRACT.

FUR (Ferric Uptake Regulator) proteins are a superfamily of transcriptional regulators. These proteins are present in most of prokaryotic organisms and play a key role in the regulation of iron homeostasis and other metals such as zinc, manganese or nickel. FUR proteins also participate in the regulation of other cellular processes such as the defense against oxidative stress, nitrogen metabolism, the differentiation of heterocysts (in cyanobacteria) or the virulence of many pathogens.

The cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120 has three Fur paralogues: FurA which is involved in the regulation of iron homeostasis; FurB or Zur is responsible of keeping zinc homeostasis and the defense against oxidative stress; FurC has been recently described as a PerR regulator in Anabaena sp. PCC 7120 involved in the regulation of peroxide stress response.

Previous studies of biochemical characterization of FurB/Zur have suggested that cysteine residues 81, 84, 121 and 124, that are part of the motif C-X-X-C, would be involved in the coordination of structural zinc. Since crystal structure of FurB is not available, the goal of this work is to provide new information about zinc coordination through the biochemical characterization of mutant proteins in the cysteine residues 81, 84, 121 and 124.

The results suggest that the residues of cysteine 81 and 84 (first motif C-X-X-C) would participate in the coordination of the structural zinc, while residues 121 and 124 (second motif C-X-X-C) would be involved in the formation of a disulfide bridge, essential to maintain the secondary structure of proteins. Besides, the mutation of any of the four residues of cysteine causes the loss of biological activity of the proteins in vitro, but do not change their ability to interact with heme group.

2.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

2.1.- Las cianobacterias.

2.1.1.- Características generales.

Las cianobacterias son organismos procariotas que pertenecen al dominio *Bacteria* y, cuya principal característica es que son organismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (Herrero, A. et al., 2001). Debido a esta característica, las cianobacterias fueron los primeros organismos responsables del aumento del oxígeno en la atmósfera, teniendo una gran importancia en la evolución del planeta Tierra y la vida que se desarrolla en él. Posteriormente con el paso del tiempo y la evolución, además de la contribución de las cianobacterias, la aparición de algas y plantas hizo que se aumentarán los niveles de oxígeno atmosférico hasta los actuales, gracias al proceso de la fotosíntesis (Xiong et al., 2002).

Actualmente las cianobacterias tienen una amplia distribución ecológica, pudiéndose encontrar en diferentes hábitats terrestres y marinos, incluyendo ambientes extremos como los desiertos, los lagos helados o las aguas termales. La morfología de éstas es muy variada, pudiendo ser unicelulares o filamentosas (Herrero, A. et al., 2001). Además de todo esto, las cianobacterias son organismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a procesos de diferenciación y especialización celular (Herrero, A. et al., 2001) (Xiong et al., 2002).

A pesar de que existe una gran variedad morfológica en las cianobacterias, en general, todas poseen una pared celular (muy similar a la de los microorganismos Gram negativos) que define su tamaño y forma, y que, ayuda a controlar el tráfico de sustancias entre el exterior y el interior celular. Esta pared está compuesta por peptidoglicanos que envuelven la membrana plasmática (Drews and Weckesser, 1982). Recubriendo la capa de peptidoglicanos, hay una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos y lipoproteínas, y, sobre esta membrana aparece la cubierta externa S que protege a la célula de las condiciones ambientales adversas (van de Meene et al., 2006).

Además, las cianobacterias tienen una gran cantidad de inclusiones intracelulares en su citoplasma como: gránulos de cianoficina, carboxisomas, gránulos de poliglucosa y poli- β -hidroxibutirato, gránulos de glucógeno, gránulos de polifosfato, gránulos lipídicos, vesículas gaseosas y ficobilisomas. La principal función de estas inclusiones es de almacenamiento de nutrientes, aunque, algunas de ellas pueden tener otro tipo de funciones (Stanier, 1988; Adams and Duggan, 1999).

2.2.2.- *Anabaena* sp. PCC 7120.

La cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosa si se atiende a su morfología (Figura 1). Las cianobacterias filamentosas tienen la capacidad de generar células diferenciadas y especializadas (supervivencia, reproducción o metabolismo) a partir del tipo celular básico o célula vegetativa. (Flores, E. and Herrero, A., 2010). En el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 se pueden encontrar tres tipos diferentes de células especializadas por diferenciación: hormigonios, acinetos y heterocistos (responsables de la fijación del nitrógeno).

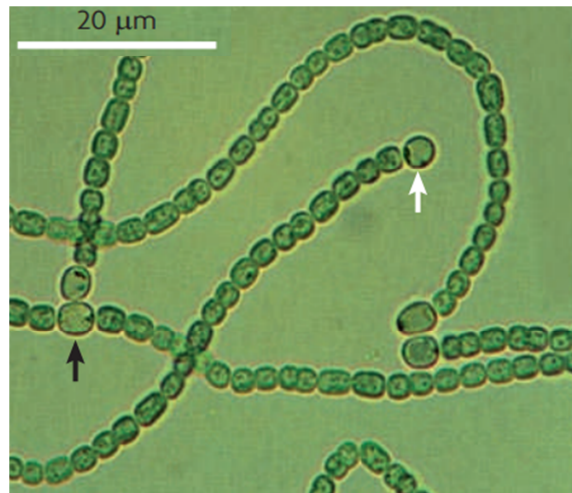


Figura 1. Filamentos de *Anabena* sp. PCC 7120. La flecha blanca señala un heterocisto terminal y la negra uno intercalado entre células vegetativas. La escala se indica sobre la barra blanca. (Flores, E. and Herrero, A., 2010).

2.2.- Metabolismo del hierro y el zinc en cianobacterias.

2.2.1.- Importancia del hierro y el zinc.

El hierro y el zinc son dos metales de vital importancia para la mayoría de los microorganismos, puesto que intervienen en numerosos procesos biológicos.

El hierro es un metal que se encuentran entre los cuatro elementos más abundantes de la Tierra. En los microorganismos el hierro forma parte de una gran cantidad de proteínas implicadas en los procesos de fotosíntesis, respiración celular, metabolismo del nitrógeno, defensa contra el estrés oxidativo, biosíntesis de DNA y regulación de genes entre otros (Andrews et al., 2003).

A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, la gran reactividad del hierro con el oxígeno hace que sea un nutriente poco biodisponible, ya que, se generan óxidos e hidróxidos insolubles que no pueden ser metabolizados por los seres vivos (Andrews et al., 2003). Por otra parte, la presencia de oxígeno en la atmósfera convierte al hierro en una especie potencialmente nociva para las células, puesto que, durante su catálisis se produce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la reacción de Fenton.

Al contrario que el hierro, el zinc apenas está presente en la Tierra (es un metal traza); sin embargo, el zinc está implicado en numerosos procesos biológicos y su deficiencia puede causar alteraciones metabólicas considerables. Sus propiedades químicas lo convierten en un metal idóneo para formar parte de muchas proteínas y enzimas, en las cuáles juega un papel estructural, catalítico o regulador. Si la función del zinc es meramente estructural, éste se suele encontrar tetracoordinado por residuos de histidina, glutamato, aspartato o cisteína, en cambio, en las enzimas se suele encontrar en el centro catalítico coordinado por tres residuos (principalmente por cisteínas) y comportándose como un ácido de Lewis fuerte (Auld, 2001).

Aunque en condiciones fisiológicas el zinc no es un metal redox activo, su capacidad para unirse y proteger grupos sulfhidrilo en las proteínas, así como, su participación en la biosíntesis de tioles de bajo peso molecular hacen que la homeostasis del zinc esté estrechamente relacionada con el mantenimiento de las condiciones redox en el interior celular (Sein-Echaluze et al., 2015).

2.2.2.- Regulación del metabolismo de metales por proteínas de la familia FUR (*Ferric Uptake Regulator*).

El hierro y el zinc son dos nutrientes esenciales para una gran mayoría de microorganismos, como ya se ha mencionado, por ello la regulación de su homeostasis es de vital importancia en función de la disponibilidad de los mismos. Esta regulación suele estar mediada, en numerosos organismos procariontes, por una familia de proteínas que se consideran reguladores transcripcionales metalodependientes (Lee and Helmann, 2007).

Los miembros de la familia FUR tienen una gran diversidad de funciones y, según el metal regulador que poseen, las proteínas de esta familia se pueden clasificar en distintas subfamilias (Lee and Helmann, 2007):

- *Fur (Ferric uptake regulator)*: han dado nombre a la familia y regulan la homeostasis del hierro utilizando la molécula de hierro como metal regulador.
- *Zur (Zinc uptake regulator)*: contienen zinc como metal regulador y se encargan de su homeostasis.
- *Nur (Nickel Uptake regulator)*: contienen níquel como metal regulador.
- *Mur (Manganese uptake regulator)*: el manganeso es el metal regulador.
- *PerR (Peroxide stress response regulator)*: contienen hierro como metal regulador, y, lo usan para catalizar reacciones de oxidación y detectar el estrés oxidativo.
- *Irr (Iron response regulator)*: el hierro-hemínico es el cofactor, de modo, que se encargan de la detección de los niveles de hemo intracelular.

A pesar de la gran diversidad de proteínas que pertenecen a esta familia, las proteínas FUR, tienen una serie de características comunes. Las proteínas FUR se caracterizan por tener un bajo peso molecular (13-20 kDa) y por poseer en su estructura primaria un motivo rico en histidinas (HHXHX₂CX₂C) altamente conservado y otro motivo C-X-X-C, aunque menos conservado que el anterior, en el extremo C-terminal (ambos motivos constituyen sitios potenciales para la unión de algún metal). Además, estas proteínas pueden unirse al DNA gracias al dominio de reconocimiento y unión N-terminal. El dominio C-terminal es el encargado de la dimerización, generando así la forma activa de las proteínas. En términos generales, las proteínas FUR, tienen un átomo de zinc denominado como “estructural”, existiendo algunas excepciones como es el caso de la proteína FurA de *Anabaena sp.* PCC 7120 (Hernández et al., 2002; Fillat, 2014).

Las proteínas FUR al tener la capacidad de unirse al DNA funcionan como reguladores transcripcionales, más concretamente como represores clásicos de genes. Ante una situación en la que hay una alta concentración de metal, las proteínas FUR reprimen la transcripción de los genes encargados de captar dicho metal mediante la interacción con el co-represor metálico. Como ya se ha comentado, esta represión génica se puede llevar a cabo gracias a la unión de un dímero de FUR (forma activa) a los promotores de los genes que se necesitan silenciar. De esta forma se impide que la RNA polimerasa tenga acceso al DNA. Por el contrario, si la concentración de metal es baja, las proteínas FUR se encuentran en su forma apo (no tienen metal), y por tanto, no son activas. En esta última situación las proteínas FUR no son capaces de unirse al DNA, de modo que, permiten la transcripción de los genes diana (Andrews et al., 2003). Más recientemente, se ha encontrado que algunos miembros de esta familia pueden actuar también como aporreguladores y, que tanto el holo como el apo regulador, también, pueden activar ciertos grupos de genes (González et al., 2012).

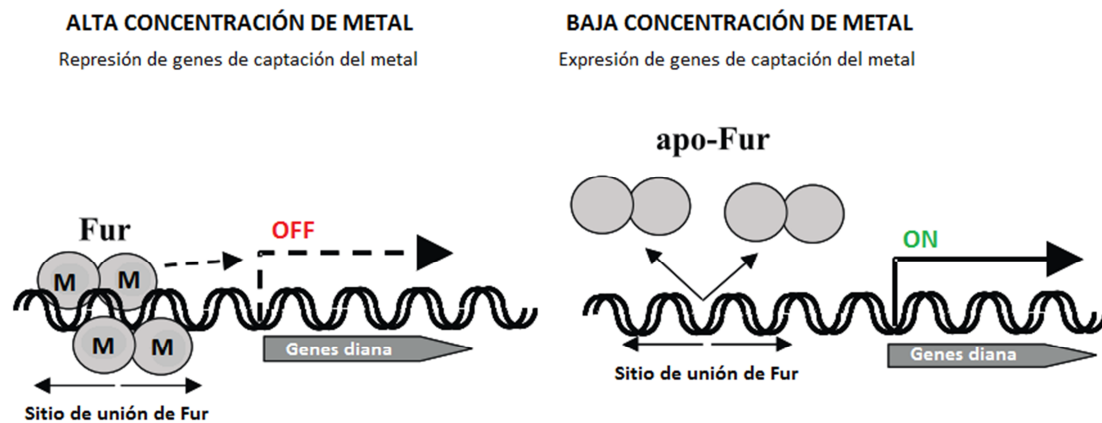


Figura 2. Mecanismo clásico de regulación transcripcional mediada por Fur. A alta concentración de metal Fur se encuentran en su forma activa (dímeros) y se une a los promotores de los genes diana impidiendo su transcripción. A baja concentración del metal Fur no es activa, por tanto, no se une a los promotores permitiendo la expresión de los genes diana (Andrews et al., 2003).

2.3.- Proteínas de la familia FUR en *Anabaena sp.* PCC 7120.

A través del análisis del genoma de *Anabaena sp.* PCC 7120 en busca del motivo rico en histidinas se pudieron encontrar tres parálogos FUR en esta especie, que se denominaron: FurA (*all169*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*) (Hernández et al., 2004). A continuación se describen algunas de las características de estas proteínas, centrándose especialmente en FurB por ser la proteína objeto de estudio en el presente trabajo.

2.3.1.- FurA.

FurA es una proteína de 151 aminoácidos que contiene el motivo rico en histidinas propio de las proteínas FUR en su secuencia. Tiene un total de cinco residuos de cisteína cuatro de los cuales se encuentran formando parte de dos motivos C-X-X-C, quedando el último aislado. Este motivo C-X-X-C se encuentra altamente conservado entre las distintas proteínas Fur de cianobacterias, por este motivo el papel que juegan estos residuos de cisteína ha sido ampliamente estudiado en el grupo de investigación (Tesis doctorales de Laura Botello-Morte y Silvia Pellicer). Además, recientemente se ha visto la implicación que tienen dichos residuos

en la actividad disulfuro reductasa de FurA (Botello-Morte et al., 2014; Botello-Morte et al., 2016).

```
MTVYTNTSLKAELNERGWRLTPQRETILHIFQELPQGEHLSAEDLYHRLEADGEGISLST 60
IYRTLKLMARMGILRELELGEGHGHYEINQPYPHHHHHLICVKCNSTIEFKNDSILKIGA 120
KTAQKEGFHLLDCQMTIHAVCPKCQRALMPL----- 151
```

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de FurA de *Anabaena sp.* PCC 7120. En rojo se resaltan los residuos de cisteína, y, en azul los residuos de histidina que forman parte del motivo $H_5X_2CX_2C$.

FurA es el miembro de la familia Fur más abundante en *Anabaena sp.* PCC 7120, y, parece que es esencial para las cianobacterias, pues los intentos llevados a cabo para inactivar su gen han resultado en estirpes no viables. Participa en el control de la homeostasis del hierro mediante la regulación transcripcional de genes que codifican para proteínas de captación y almacenamiento del metal (González et al., 2012) (López-Gomollón et al., 2007). Además, en condiciones reductoras y en presencia del co-represor, FurA es capaz de unirse a su propio promotor, y, a los promotores de FurB, FurC y de todos los genes diana que regula (Hernández et al., 2006).

Cabe destacar que FurA también es capaz de interactuar con el grupo hemo a través del motivo de unión Cys-Pro que posee. Esa interacción de la proteína con el grupo hemo impide que se una al DNA y, por lo tanto, su funcionamiento como represor transcripcional. De esta forma el grupo hemo estaría actuando como una molécula capaz de modular la actividad de FurA (Hernández et al., 2004).

2.3.2.- FurB.

2.3.2.1.- Aspectos generales.

La proteína FurB tiene un total de 132 aminoácidos, siendo cinco de ellos residuos de cisteína. Como ocurre con FurA, uno de los residuos de cisteína (C93) queda aislado, mientras que, los cuatro restantes están formando parte de dos motivos C-X-X-C (C81-L-Q-C84; C121-G-K-C124).

```
MRAIRTRSQERILNLLQTIKQGISAQDIYVELRNRNQSMGLATVYRSLEALKLEGLVQVR 60
TLPNGEALYSLAQQDKHHLTCLQCGVSIPIHQCPVHNLEEQLQTAHKFKIFYHTLEFFGL 120
CGKCCQMNHASEI----- 132
```

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de FurB de *Anabaena sp.* PCC 7120. En rojo se resaltan los residuos de cisteína, y, en azul los residuos de histidina que forman parte del motivo $H_2X_2CX_2C$.

FurB se encarga de modular la homeostasis del zinc en *Anabaena sp.* PCC 7120, actuando como una proteína Zur. Esto implica que FurB/Zur se une a los promotores de los genes que regula de forma dependiente a la concentración de zinc, controlando, así, la captación y almacenamiento del metal en la cianobacteria. Si existe la presencia de un quelante de zinc, la afinidad de la proteína por el DNA se ve disminuida (Napolitano et al., 2012).

Además de regular transcripcionalmente genes del metabolismo del zinc, se ha visto que FurB también está implicado en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al.,

2015). Estudios de caracterización fenotípica de un mutante de sobreexpresión de la proteína FurB/Zur y, de otro mutante de delección del gen de la proteína FurB/Zur permitieron, en primer lugar, comprobar que la proteína FurB/Zur no era esencial para el crecimiento de *Anabaena sp.* PCC7120, ya que, aunque la tasa de crecimiento fotoautotrófico era menor en el mutante de delección respecto a la estirpe silvestre y de sobreexpresión, éste se podía mantener bajo las condiciones estándar de cultivo (Sein-Echaluze et al., 2015), cosa que no ocurre, por ejemplo, al tratar de obtener un mutante de delección para la proteína FurA.

Por otra parte, estudios realizados sobre los mutantes de sobreexpresión y delección de FurB/Zur mediante diversas técnicas de microscopia, han permitido conocer que se mantiene una uniformidad en el tamaño de las células, a pesar de la introducción de las mutaciones. Además, la capacidad de autofluorescencia que poseen las cianobacterias debido a la presencia de la ficocianina (una ficobiliproteína que emite fluorescencia entorno a los 650 nm), no se vió alterada en los mutantes respecto a la proteína nativa. Una diferencia que se encontró entre los mutantes y la proteína nativa fue que el mutante de sobreexpresión tenía una mayor rugosidad en su superficie celular, mientras que, el mutante de delección poseía un septo más estrecho. Estas diferencias son debidas a la alteración de la expresión de genes que codifican proteínas de membrana y, cuya expresión está regulada por FurB (Sein-Echaluze et al., 2015) (Napolitano et al., 2012).

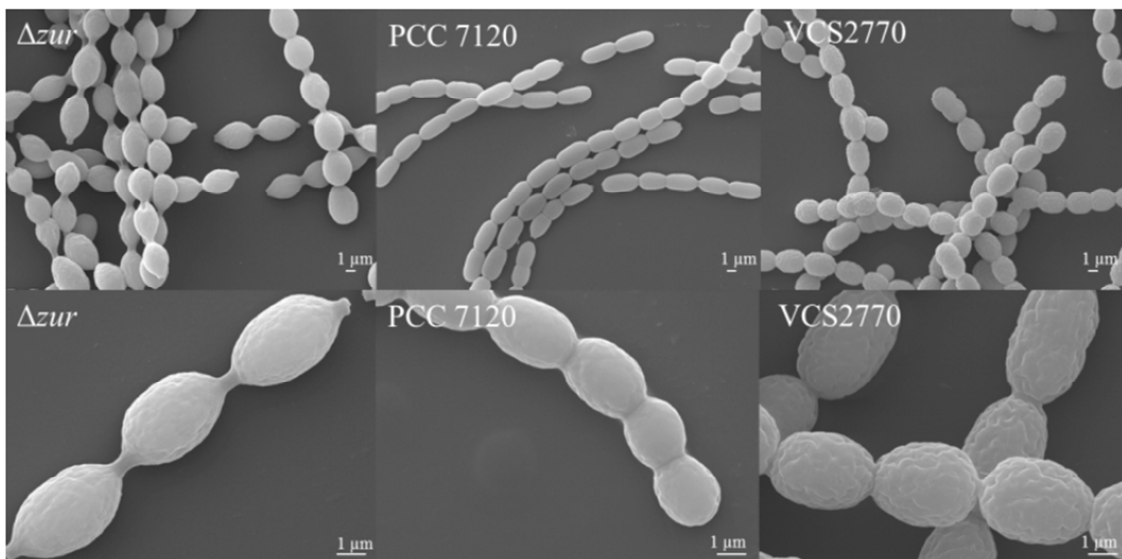


Figura 5. Fotografías de microscopia de barrido de los mutantes de delección (Δzur) y sobreexpresión (VCS2770), y de la estirpe nativa (PCC 7120). Análisis de la superficie de las diferentes estirpes en cultivos en fase exponencial. La barra blanca indica la escala (Sein-Echaluze et al., 2015).

2.3.2.2.- Papel de FurB/Zur en la tolerancia a estrés oxidativo.

La delección del gen de la proteína FurB/Zur incrementa la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que, el exceso de expresión de la proteína provoca un aumento en la tolerancia al estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al., 2015). Los niveles de actividad catalasa (una de las principales enzimas implicadas en la defensa frente a estrés oxidativo) son inversamente proporcionales a la cantidad de FurB/Zur intracelular, es decir, el mutante de delección presentaba una actividad catalasa superior en comparación con las estirpes nativa y

de sobreexpresión, lo cual concuerda con el hecho de que en este mutante de delección los niveles de peróxido de hidrógeno endógenos se encontraran disminuidos respecto a la estirpe nativa. Sin embargo, en el caso del mutante de sobreexpresión los niveles de H_2O_2 endógenos, sorprendentemente, tenían el mismo orden de magnitud que aquellos encontrados en el mutante de delección. Esto sugiere que la sobreexpresión de la proteína FurB en cianobacterias conduce, de alguna forma, a una situación de menor estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al., 2015). Por tanto, con todos los datos anteriores, se puede concluir que un nivel de expresión adecuado de FurB/Zur es necesario para un correcto control de la respuesta frente al estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al., 2015), tal y como se pudo observar en la figura 6 que se presenta a continuación:

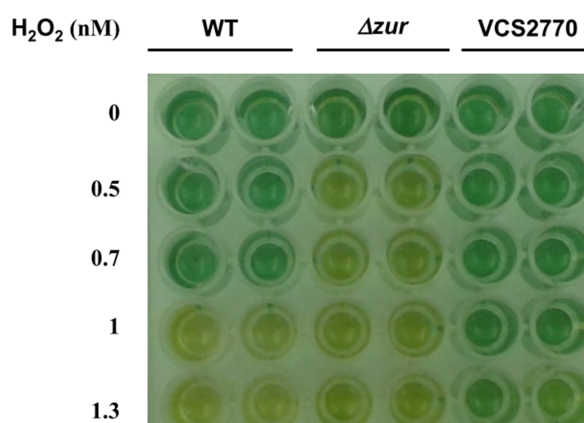


Figura 6. Tolerancia al peróxido de hidrógeno de los mutantes de delección (Δzur) y sobreexpresión (VCS2770). Fotografía de la placa con los distintos cultivos y concentraciones de H_2O_2 . Se muestran duplicados por cada cultivo y condición (Sein-Echaluze et al., 2015).

Al igual que FurA, se ha descrito que FurB tiene la capacidad de unirse al resto de promotores de las proteínas Fur presentes en *Anabaena sp.* PCC 7120 (incluyendo el suyo propio). Además, se observó que ante una situación de ausencia de estrés oxidativo, los niveles de transcripción de la proteína FurB/Zur eran bajos, sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo su transcripción aumentaba uniéndose de forma inespecífica al DNA y protegiéndolo, así, de la degradación provocada por radicales hidroxilo, o, acción de la enzima DNasaI. Debido a esto, se puede concluir que FurB/Zur actúa como un regulador génico, o bien, como protector del DNA en función de los niveles de expresión en las cianobacterias (López-Gomollón et al., 2009).

2.3.2.3.- Características estructurales de FurB/Zur.

La proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120 todavía no ha sido cristalizada, por tanto, toda la información conocida respecto a su estructura está basada en modelos estructurales construidos a partir de las estructuras de proteínas FurB de otros organismos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, o, *Sterptomyces coelicolor*, que sí se han conseguido cristalizar. Además, un estudio del alineamiento de secuencias de algunas de las proteínas Zur conocidas hasta la fecha, ha permitido saber que existen cuatro residuos de cisteína altamente conservados entre las diferentes proteínas Zur que están formado parte de dos motivos C-X-X-C (Fillat, 2014). En el caso de la proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120, estos cuatro residuos se corresponderían con las cisteínas 81, 84, 121 y 124 (Tesis

Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016). La proximidad y disposición de estos residuos de cisteína en el modelo estructural de FurB/Zur, sugieren que éstos estarían participando en la coordinación del átomo de zinc estructural, característico de las proteínas de la familia FUR (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016). Esto último, además, estaría en concordancia con estudios que se han llevado a cabo con otras proteínas Zur en las que el zinc estructural suele encontrarse en un entorno tetraédrico, coordinado por cuatro residuos de cisteína (Fillat, 2014).



Figura 7. Modelo tridimensional de FurB de *Anabaena sp.* PCC 7120. Modelo realizado con SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) y editado con Swiss-PdbViewer v4.1 (<http://spdbv.vital-it.ch/>). Se muestran en rojo las hélices α y en amarillo las láminas β . Los residuos de cisteína de la proteína se encuentran señalados con el círculo y la flecha verdes (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 216).

Un estudio de ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) realizado sobre la proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120 confirmó la existencia de un átomo de zinc estructural en la proteína, ya que este metal se encontraba en una proporción de un mol por mol de proteína en su forma monomérica (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

Posteriormente, estudios de ITC (*Isothermal Titration Colorimetry*), en presencia de un agente reductor, revelaron que aparte del sitio de unión estructural del zinc existían otros dos sitios de unión al metal, denominados como sitios reguladores; aunque todavía se desconoce la función de los mismos en el mecanismo de regulación transcripcional mediado por la proteína FurB/Zur. Puesto que el modelo estructural de FurB/Zur permitía pensar, casi con total seguridad, que los residuos de cisteína 81, 84, 121 y 124 estaban implicados en la coordinación del zinc estructural, se sugirió que la cisteína 93, que era el residuo que quedaba aislado (no formaba parte de ninguno de los motivos C-X-X-C), era la responsable de la unión del zinc en uno de los dos sitios reguladores, aunque no se podía descartar la participación de otros residuos tales como Asp75, His77, His96 e His133 que ocupan lugares equivalentes a los residuos encontrados en la coordinación del zinc regulador en las proteínas FurB/Zur de *M.tuberculosis* y *S.coelicolor*. Por otra parte y al igual que en el caso anterior, gracias a la equivalencia de residuos con estructuras de la proteína FurB/Zur ya resueltas, se pudo determinar que los residuos con más probabilidad de estar implicados en la coordinación del zinc en el tercer sitio de unión regulador son: Gln21, Gln 58, Gln73, Asp75 e His78 (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

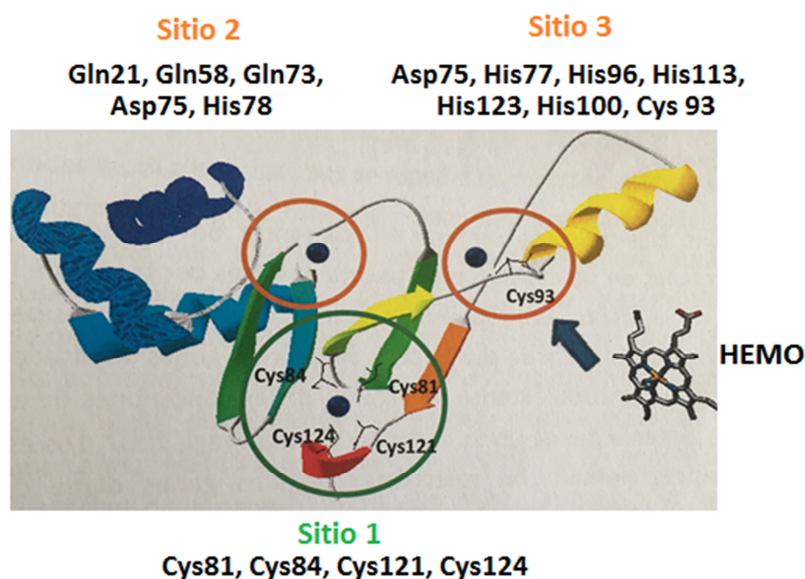


Figura 8. Esquema mostrando los sitios de unión a zinc propuestos. Se muestra el modelo de FurB realizado en base a la estructura de FurB de *M.tuberculosis*. Se muestran los residuos de cisteína de la proteína y la posible localización de los átomos de zinc (esferas azules). En verde se encuentra rodeado el sitio de unión al zinc estructural y en naranja se señalan los sitios reguladores. Además se muestran los residuos que probablemente estén implicados en la coordinación del metal en cada uno de los tres sitios de unión (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluze, 2016).

Por último, cabe mencionar que FurB/Zur, también, puede unirse al grupo hemo a través del motivo de unión Cys (93)-Pro-Val. Esta interacción se ha descrito como una interacción que inhibe por completo la posibilidad de unión de la proteína al DNA, por ello se piensa que este motivo y el motivo Cys-Pro de FurA, son motivos reguladores que moderan la unión no covalente de proteínas al grupo hemo (López-Gomollón et al., 2009).

2.3.3.- FurC.

FurC consta de 149 aminoácidos. En este caso sólo tres de los residuos son de cisteína y ninguno de ellos forma parte del motivo C-X-X-C como ocurría con FurA y FurB.

```

MQQQAISTKPIRSLEDALERCQLLGMRVSRQRRFILELLWQANEHLSAREIYDRLNQQGK 60
DIGHTSVYQNLEALSTQGIIESIERCDGRLYGNISDSHSHVNCLDTNQLDVIHLPEAF 120
IQEVEQRTGVKITDYSINFYGYRHPQDEE----- 149
    
```

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de FurC de Anabaena sp. PCC 7120. En rojo se resaltan los residuos de cisteína, y, en azul los residuos de histidina que forman parte del motivo HXHX₂C X₂T.

A diferencia de las anteriores, FurC no es capaz de unirse a ninguno de los promotores de las proteínas Fur de *Anabaena sp.* PCC 7120 en las condiciones determinadas para el resto de los parálogos (presencia de metal divalente y condiciones reductoras). Sin embargo, estudios de retardo en gel sugieren que la presencia de FurC sería necesaria para modular la actividad de FurA y FurB, aumentando la capacidad de FurA para unirse al DNA y, disminuyendo la de FurB (Hernández et al., 2004).

Recientemente se ha propuesto que FurC actuaría como el regulador PerR de *Anabaena sp.* PCC 7120, implicado en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo por peróxido debido a la alta respuesta de este gen frente a dicha situación (Yingping et al, 2011).

La proteína FurC carece de un motivo Cys-Pro, o, Cys-Pro-Val en su secuencia, por tanto, y al contrario que FurA y FurB no es capaz de interactuar con el grupo hemo (López-Gomollón et al., 2009).

Tabla 1: Propiedades bioquímicas de las proteínas Fur de *Anabaena sp.* PCC 7120.

Proteína	Gen	PM (Da)	ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)	pI	Cys	Motivos C-X-X-C	His	Motivo rico His	Unión hemo
FurA	<i>all1691</i>	17259	13760	6.8	5	2	12	H ₅ X ₂ CX ₂ C	+
FurB	<i>all2473</i>	15116	5720	8.7	5	2	7	H ₂ X ₂ CX ₂ C	+
FurC	<i>alr0957</i>	17328	13490	5.3	3	0	6	HXHX ₂ CX ₂ T	-

3.- OBJETIVOS.

Este trabajo tiene como objetivo principal estudiar el papel que juegan los residuos de cisteína que forman parte de los motivos C-X-X-C en el funcionamiento y bioquímica del regulador transcripcional FurB de *Anabaena* sp. PCC 7120, incluyendo la coordinación del metal zinc, su actividad y su unión al grupo hemo. Para alcanzar dicho objetivo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Expresión recombinante y purificación de las proteínas simples mutantes para los motivos C-X-X-C.
- Caracterización bioquímica de dichas proteínas mutantes.
- Análisis funcional de las proteínas mutantes respecto a su unión a Zn^{2+} y a DNA.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas que se utilizaron para la realización de este trabajo se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: Cepas bacterianas usadas en el trabajo.

Cepa Bacteriana	Principal Uso
<i>E.coli</i> DH5- α	Replicación y mantenimiento del plásmido
<i>E.coli</i> BL 21	Sobreexpresión proteína mutante

Para el cultivo de las cepas bacterianas nombradas anteriormente, se utilizó medio de cultivo Luria Bertani, LB (triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; cloruro sódico 5 g/L). En caso de que éste se necesitase en su forma sólida lo que se hizo fue añadir agar 1.5 %. La mayoría de los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C y con agitación a 200 rpm, a excepción de, los cultivos que se usaron para la expresión recombinante de las proteínas mutantes que fueron inducidos con IPTG e incubados a 15 °C y 200 rpm. En todos los casos los medios de cultivo fueron suplementados con el antibiótico kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL.

4.2.- Obtención de células competentes y transformación por choque térmico.

Para utilizar la bacteria *E. coli* como herramienta de trabajo en biología molecular, ya sea para la multiplicación y purificación de vectores plasmídicos, o, para la sobreexpresión de proteínas recombinantes, es necesario que las células se encuentren en un estado de “competencia”, es decir, que sean capaces de incorporar, con relativa facilidad, DNA exógeno. En nuestro caso se trabajó con células quimiocompetentes, que, posteriormente fueron transformadas mediante choque térmico.

4.2.1.- Generación de *E.coli* quimiocompetentes.

A partir de un cultivo de *E.coli* DH5- α , o, BL 21 crecido en 10 mL de medio LB a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche (O/N), se realizaron los siguientes pasos para conseguir células quimiocompetentes:

1. Se inocularon 200 mL de medio LB con 1 % del cultivo O/N y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.35-0.45$.
2. Alcanzada esa DO_{600} , se incubó el cultivo en hielo durante 20 min.
3. Se centrifugó 15 min, 4000 rpm y 4 °C.
4. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1-2 mL de *buffer* 1 ($CaCl_2$ 0.13M + $MgCl_2$ 0.15 M + NaAC 0.04 M) estéril y frío. Se completó hasta un volumen final de 40 mL.
5. Se centrifugó 15 min, 4000 rpm y 4 °C. Se desechó el sobrenadante.
6. Se resuspendió el precipitado en 4 mL de *buffer* 2 ($CaCl_2$ 0.13M + 15 % glicerol) estéril y frío.
7. Se hicieron alícuotas de 200 μ L en tubos eppendorf estériles. Se guardaron dichas alícuotas a -80 °C.

4.2.2.- Transformación de cepas de *E.coli* con plásmidos mediante choque térmico.

Las células quimiocompetentes son capaces de internalizar en su interior DNA exógeno, y, así replicar el plásmido (DH5- α), o, expresar una proteína recombinante de interés (BL 21). Para transformar dichas células se siguieron los siguientes pasos:

1. Se descongeló la cantidad necesaria de *stock* de células quimiocompetentes en baño de hielo.
2. Se añadió sobre las células descongeladas 1 μ L del plásmido de interés, se mezcló suavemente y se incubó 30 minutos en hielo.
3. Pasado el tiempo de incubación, se les aplica a las células el choque térmico a 42 °C durante 90 segundos.
4. Se transfirieron las células inmediatamente a hielo y se mantuvieron allí durante 90 segundos.
5. Se añadieron 800 μ L de medio LB (sin antibiótico) sobre las células y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y con agitación suave.
6. Transcurrido este tiempo de incubación se transfirió el cultivo a una placa de LB agar con antibiótico, se sembró el inóculo con ayuda de un asa de siembra y se incubó a 37 °C O/N.

4.3.- Preparación de plásmidos liofilizados.

En el presente trabajo se han analizado cuatro proteínas mutantes simples para los residuos de cisteína que forman parte de los motivos C-X-X-C (Cys81, Cys84, Cys121 y Cys124) del regulador transcripcional FurB de *Anabaena sp.* PCC 7120. Cada una de las versiones del gen de la proteína FurB mutado fue clonada en el vector pET28a (ANEXO Figura 1), de forma que, la proteína recombinante tuviera una cola de histidinas en el extremo N-terminal para facilitar su posterior purificación. Los plásmidos pET28a con el gen de FurB mutado se nos suministraron en forma de liofilizado. Estos plásmidos se utilizaron para la transformación de las cepas bacterianas de interés, por tanto, antes de usarlos hubo que reconstituirlos. Para llevar a cabo este proceso se realizaron las siguientes acciones:

1. El liofilizado se centrifugó durante un minuto, 6000 rpm, 4 °C.
2. Se añadieron 20 μ L de agua MQ estéril para disolver el liofilizado.
3. Se agitó en vórtex durante un minuto.
4. Se dejó la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y se volvió a agitar un minuto en vórtex.
5. El plásmido ya está listo para su uso.

4.4.- Sobreexpresión de las proteínas recombinantes.

Una vez transformada la cepa de *E.coli* BL21 con el plásmido pET28a correspondiente, lo primero que hay que hacer es obtener la cantidad de biomasa suficiente e inducir la expresión de la proteína de interés de forma adecuada.

4.4.1.- Prueba de expresión.

La expresión de las proteínas recombinantes, que se encuentran en el plásmido pET28a, está bajo el control del promotor *lac*, el cual es inducible en presencia de isopropil- β -D-

tiogalactopiranosido, IPTG (ANEXO Figura 2). Antes de proceder a la producción de biomasa, se realizó una prueba de expresión a pequeña escala. Para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se inocularon 10 mL de medio LB (con el antibiótico correspondiente) con una colonia de *E.coli* recién transformada. En total se inocularon 4 tubos Falcon de 10 mL de medio LB, cada uno con una de las colonias seleccionadas para analizar.
2. Se incubaron los 4 cultivos a 37 °C, 200 rpm, O/N. Hay que tener una réplica de cada una de las colonias seleccionadas para el análisis en una placa de LB/antibiótico (así se puede disponer de la que exprese más cuando sea necesario).
3. Se refrescaron los cultivos añadiendo 100 µL del cultivo O/N a 10 mL de medio LB (con el antibiótico correspondiente).
4. Se incubaron a 37 °C, 200 rpm hasta que la $DO_{600} = 0.5$ (aprox. 2-3 horas).
5. Una vez alcanzada la DO_{600} (0.5), se traspasaron 5 mL de cada cultivo a un Falcon nuevo que se indujeron con 0.8 mM de IPTG (5 µL IPTG 0.8 M).
6. Se incubaron 8 Falcon (4 inducidos y 4 sin inducir) a 15 °C, 200 rpm, O/N.
7. Se comprobó por SDS-PAGE cuál de los cultivos sobreexpresa más cantidad de proteína, para lo que se prepararon las muestras de la siguiente forma:
 - Se añadió 1 mL de cada cultivo a un eppendorf y se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima, eliminando el sobrenadante.
 - Se resuspendió el precipitado en 40 µL de agua MQ y 40 µL de tampón de carga, SB, 2X (10 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 1.6 %, glicerol 7 %, azul de bromofenol 0.01 % y β -mercaptoetanol 5 %).
 - Se hirvieron las muestras 5 minutos a 97 °C.
 - Se centrifugaron 5 minutos a velocidad máxima.
 - Se aplicaron 10 µL del sobrenadante en el pocillo del gel SDS-PAGE.
 - Se realizó la electroforesis a 35 mA/gel.

4.4.2.- Generación de biomasa e inducción.

Una vez se ha llevado a cabo la prueba de expresión y se ha comprobado que las células sobreexpresan de forma correcta la proteína recombinante de interés, se pasa a generar biomasa mediante el proceso que se describe a continuación:

1. Se seleccionó la colonia de mayor expresión y se inocularon 10 mL de medio LB (con antibiótico) con la réplica de esa colonia que se tiene en la placa de LB agar.
2. Se incubó a 37 °C, 200 rpm, O/N.
3. Se inocularon 10 mL del cultivo O/N en Erlenmeyers con 1 L de medio LB (con antibiótico) cada uno.
4. Se incubaron a 37 °C, 200 rpm hasta que la $DO_{600} = 0.5$, cuando se alcanzó esa densidad óptica se indujo con IPTG 0.8 mM (1000 µL IPTG 0.8 M).
5. Se incubaron a 15 °C, 200 rpm, O/N.
6. Se recogieron las células por centrifugación a 8000 rpm, 10 min, 4 °C
7. Las células se congelaron a -20 °C hasta su uso.

4.4.3.- Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

La electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se utilizó para analizar el nivel de expresión de las proteínas mutantes en cada uno de los cultivos. Las muestras que se cargaron en un gel de poliacrilamida al 17 % (Tabla 3), y, se realizó la electroforesis a 35 mA/gel durante, aproximadamente, 45 min. Los geles se tiñeron con azul de *Coomassie* durante 30 min en agitación, y, se destiñeron con una solución de decoloración.

Tabla 3: Composición de los geles de SDS-PAGE.

Componentes	Gel separador 17 %	Gel concentrador 5 %
Agua MQ	0.36 mL	1.4mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.24 mL	--
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	--	0.25 mL
Bisacrilamida 30 %	3 mL	0.33 mL
SDS 10 %	30 µL	10 µL
PSA 10 %	20 µL	10 µL
TEMED	10 µL	10 µL

4.5- Purificación de las proteínas recombinantes.

4.5.1.- Lisis celular.

Antes de purificar la proteína es necesario lisar la biomasa. En este caso se va a hacer uso del proceso de sonicación. El protocolo de sonicación consta de los siguientes pasos:

1. Se descongeló la biomasa que se resuspendió en tampón de purificación (2 M cloruro de guanidinio, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, pH 8). Se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, (inhibidor de serín-proteasas) a una concentración final de 1 mM.
2. Se sometió la suspensión celular a 10 ciclos de 45 segundos de sonicación con 30 segundos de reposo entre cada ciclo, empleando una amplitud del 90 % y ciclo 0.5.
3. Se centrifugó a 18000 rpm, 30 minutos, 4 °C.
4. Se filtró el extracto con un filtro de 0.22 µm. Se conservó el lisado en frío hasta su purificación.

4.5.2.- Empaquetado y equilibrado de la columna IMAC (*Ion Metal Affinity Chromatography*).

Para purificar la proteína FurB mutante, con cola de histidinas en el extremo N-terminal, del extracto proteico correspondiente se utilizó una columna de afinidad a un ión metálico empleando la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow*. La preparación de la columna de afinidad incluye los siguientes pasos:

1. Se aplicó la matriz sobre la columna hasta conseguir unos 10 mL de resina empaquetada.
2. Se lavó con 10 volúmenes de agua MQ a 3 mL/min para eliminar el etanol en el que se preserva la matriz utilizada. La velocidad de flujo indicada anteriormente es que la se empleó durante todo el proceso de purificación.
3. Se aplicaron 3 volúmenes de ZnSO_4 0.25 M para cargar la columna con el metal.

4. Se aplicaron 5 volúmenes de agua MQ para eliminar el exceso de metal no adherido.
5. Se aplicaron 5 volúmenes de tampón de purificación (2 M cloruro de guanidinio, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, pH 8) para equilibrar la columna.

4.5.3.- Purificación mediante IMAC-Zn²⁺.

Una vez preparada la columna con el metal al que se va a unir la proteína de interés, se procedió a cargar el extracto proteico:

1. Se aplicó el extracto a la columna con una velocidad de 3 mL/min. Es importante colectar y guardar la totalidad del volumen muerto para verificar que la proteína no se encuentra en esta fracción.
2. Se aplicó el tampón de lavado (35 mM de glicina en tampón de purificación) hasta que la DO_{280} del eluido tenga un valor menor a 0.1. La glicina provoca la elución de las proteínas unidas a la columna con baja afinidad por competición con éstas por los iones metálicos.
3. Se eluyó la proteína de interés usando un gradiente creciente de imidazol (0-1 M). El eluido se recogió en alícuotas de 1 mL aproximadamente que posteriormente se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Esto va a permitir ver qué alícuotas contienen la proteína de interés en mayor cantidad y si ésta está acompañada de alguna proteína no deseada. Las alícuotas con mayor cantidad de proteína se combinaron, dializaron y concentraron.
4. Se regeneró la columna pasando 5 volúmenes de agua MQ, 0.5 volúmenes de *Strip Buffer* (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8), 3 volúmenes de NaCl 0.5 M, 5 volúmenes de agua MQ y 5 volúmenes de etanol al 20 %.

4.5.4.-Precipitación con TCA (ácido tricarbóxico).

Este procedimiento de precipitación con TCA 10 % es un paso previo que debe realizarse antes de cargar una muestra de proteína recién purificada en un gel de SDS-PAGE. Este requerimiento se debe al uso de cloruro de guanidinio en el tampón de purificación, dicho compuesto debe eliminarse para que no interfiera durante el proceso de electroforesis y se obtengan, así, resultados óptimos. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Se mezcló en un tubo eppendorf 15 μL de la muestra a analizar, 85 μL de agua MQ y 100 μL de TCA 10 %. Se dejó la mezcla incubando en hielo durante 15 minutos.
2. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a velocidad máxima, 10 min, 4 °C.
3. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron sobre el precipitado 200 μL de acetona fría.
4. Se centrifugó a velocidad máxima, 10 min, 4 °C.
5. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente (10 minutos aproximadamente para eliminar los restos de acetona).
6. Se resuspendió el precipitado en 10 μL de agua MQ y 10 μL de SB (tampón de carga) 2X.
7. Se hirvieron las muestras 5 minutos a 97 °C. Pasado este tiempo se incubaron durante un minuto en hielo.
8. Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima.
9. Se cargaron 15 μL del sobrenadante en el gel de electroforesis SDS-PAGE.

4.5.5.- Diálisis, cuantificación y concentración.

Una vez se han purificado las proteínas, y, se ha realizado una electroforesis de las alícuotas obtenidas en dicho proceso, aquellas con una mayor cantidad de proteína se combinaron y se dializaron. Las proteínas se sometieron a 4-5 ciclos de diálisis en 3 L de tampón acético-acetato 10 mM, pH 5.5 en frío. Tras estos ciclos de diálisis el contenido de la tripa se alicuotó y se conservó a - 20 °C.

Para cuantificar las proteínas se realizó un espectro de las mismas, y, mediante la ley de Lambert-Beer se calculó la concentración, conociendo el coeficiente de extinción molar teórico de las mismas (ϵ) y el valor de absorbancia a 280 nm.

$$\text{Absorbancia } (\lambda) = \text{concentración} \cdot \epsilon \cdot l$$

Si la concentración proteica obtenida es muy baja, se procede a concentrar las proteínas. Para ello se utilizó un dispositivo Amicon 3K (miliopore).

4.6.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas recombinantes.

4.6.1.- Determinación de la presencia de Zn^{2+} por ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*).

Los análisis mediante ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) permiten la determinación de la cantidad de zinc en una solución por mol de proteína. Las muestras que fueron analizadas mediante esta técnica se prepararon de la siguiente forma: sobre un tubo falcon de 15 mL se añadieron 7-8 mL de ácido nítrico 5 %, a continuación, se añadió la cantidad de proteína adecuada para ajustarla a una concentración mínima de 0.01 mg/mL, y, por último se enrasó hasta 10 mL con el ácido nítrico. Una vez obtenidos los resultados y conociendo el volumen de proteína que se añadió a los 10 mL de ácido nítrico y la concentración de ésta, se pudo calcular la cantidad de metal por mol de proteína que contenía la solución.

4.6.2.- Ensayos de retardo en gel (EMSA).

El ensayo de retardo en gel permite evaluar la actividad biológica de proteínas de unión a DNA. Esta técnica se basa en la interacción *in vitro* del regulador transcripcional con una secuencia de DNA diana conocida. Al producirse la interacción DNA-proteína en condiciones óptimas, se forman complejos cuyo peso molecular es mayor que aquel correspondiente al DNA libre, de modo que, dichos complejos pueden diferenciarse de este DNA por tener una menor movilidad electroforética. Para llevar a cabo este ensayo fue necesaria la presencia de un DNA competidor al cuál la proteína objeto de estudio no se una (en nuestro caso en particular se trata del promotor del gen *nifJ* de *Anabaena sp.*). La presencia de este DNA competidor sirvió para comprobar que la unión de la proteína al DNA diana no es inespecífica.

Se utilizaron geles no desnaturizantes con un porcentaje de poliacrilamida del 6 %, ya que dicho entrecruzamiento es lo suficientemente bajo como para permitir la migración de los complejos DNA-proteína que se formen. La composición de los geles se detalla a continuación:

Tabla 4: Composición de los geles de EMSA.

REACTIVO	VOLUMEN
Acrilamida:bisacrilamida 30%	2.06 mL
Running Buffer 5X (30.28 g/L Tris, 142 g/L glicina, pH 8)	1.86 mL
Glicerol 50%	1.4 mL
Agua MQ	4.86 mL
PSA 10%	50 μ L
TEMED	20 μ L

Las mezclas de reacción con un volumen final de 20 μ L tenían la siguiente composición:

- 100 ng de cada uno de los promotores (competidor o inespecífico y promotor objeto de estudio).
- Proteína a diferentes concentraciones, indicadas en cada caso en concreto, en el rango de nM (nanomolar).
- Tampón de unión 10X (100 mM bis-Tris pH 7.5, 400 mM KCl, 20 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y glicerol 50%).
- 0.05 mg/mL de BSA.
- 1 mM DTT.
- 5 μ M $ZnSO_4 \cdot H_2O$.

Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se les añadieron 3 μ L de tampón de carga 6X (35 mM bis-Tris pH 8, 30 % glicerol y 0.05 % azul de bromofenol).

Los geles de electroforesis se pre-corrieron durante 45 minutos a 60 V y 4 $^{\circ}$ C con *buffer* de electroforesis 6.05 g/L Tris, 28.4 g/L glicina, pH 8 (con esta operación se consiguen eliminar los residuos que pudieran dificultar la movilidad de las muestras y, además, se equilibra el gel con el tampón). Transcurrido el tiempo indicado, se cargaron las muestras en el gel y se realizó la electroforesis durante aproximadamente 2 horas a 90 V y 4 $^{\circ}$ C. Finalmente los geles se tiñeron en cubetas con 50 mL del *buffer* de electroforesis y 5 μ L de *SYBR Safe 10000X* y se visualizaron en un dispositivo GelDoc.

4.7.3.- Dicroísmo circular.

El ensayo de dicroísmo circular proporciona un espectro del cual se puede obtener información sobre la estructura secundaria de la proteína objeto de estudio si se realiza sobre la región lejana del ultravioleta. Para realizar este espectro se partió de una solución proteica cuya concentración fue 20 μ M. Se utilizó un espectro (Chirascan) y se realizaron barridos entre 195 nm y 265 nm.

4.6.4.- Ensayo de oligomerización.

En este ensayo se somete a las proteínas a condiciones reductoras y oxidantes para ver, mediante un análisis electroforético, la contribución de los posibles puentes disulfuro de las proteínas en la oligomerización de las mismas en solución. Para ello se usó el DTT como agente reductor y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como oxidante.

En un volumen final de 20 μL se añadieron 5 μg de la proteína FurB nativa, así como, de los mutantes simples para las cisteínas: C81A, C84A, C121A y C124A. Estas muestras se trataron con DTT (concentración final 10 mM), con H_2O_2 (concentración final 1mM) o sin ninguno de los dos agentes anteriores (esta muestra sirvió como control). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Pasado este tiempo se añadieron 3 μL de SB (tampón de carga) 6X sin β -mercaptoetanol. Se incubaron las muestras a 97 °C durante 5 min y se centrifugaron otros 5 min a velocidad máxima antes de cargarlas en el gel SDS-PAGE.

4.6.5- Ensayo de unión al grupo hemo.

Para llevar a cabo este ensayo se usó de la espectroscopia diferencial.

1. En primer lugar se preparó una disolución de hemo en etanol e hidróxido de sodio, NaOH.
2. Una vez preparada la solución de hemo se hizo un espectro de la misma para calcular con exactitud la concentración de dicha solución, utilizando ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción molar del grupo hemo a 385 nm en NaOH.
3. A partir de la disolución de hemo anterior, se preparó una disolución de hemo 2 μM en Tris 50 mM pH 8.
4. Partiendo de una solución de proteína a una concentración de 25 μM , se fueron haciendo adiciones de 1 μL de proteína sobre la solución de hemo 2 μM hasta alcanzar los 6 μL añadidos.
5. A partir de este momento, se adicionaron 2 μL de proteína hasta alcanzar la saturación (momento en el que la variación de absorbancia entre el máximo y el mínimo se mantiene constante).

Para que la cubeta de referencia tuviera, siempre, el mismo volumen que la cubeta con la muestra, se añadió sobre la primera la misma cantidad de *buffer* que de proteína en la segunda. El *buffer* que se añadió fue aquel en el cual se encontraban las proteínas disueltas (acético-acetato 10 mM pH 5.5).

4.7.- Obtención de DNA genómico de *Anabaena sp.* y promotores.

El DNA genómico de *Anabaena sp.* se utilizó en el presente trabajo para amplificar diversos promotores de interés.

4.7.1.-Extracción de DNA genómico de *Anabaena sp.*

Para obtener dicho DNA se necesita un cultivo de *Anabaena sp.* con un contenido en clorofila de 5-6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una $\text{DO}_{600} = 1.5$. A partir de 50 mL de un cultivo de *Anabaena sp.* en las condiciones citadas, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se centrifugó en tubos Falcon a 4000 rpm, 5 min y temperatura ambiente.
2. Se decantó el sobrenadante y se repartieron las células en dos tubos eppendorf con tapón de seguridad.
3. Se resuspendieron en 400 μL de Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 0.1 mM.
4. Se añadieron 20 μL de SDS 10 %, 450 μL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y 150 μL de perlas de vidrio (3-4 puntas de espátula).

5. Las células se rompieron mediante 4 ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex y un minuto de reposo en hielo.
6. Se centrifugó a 13000 rpm, 15 min y 4°C. Se transfirió la parte superior acuosa a tubos eppendorf nuevos.
7. Se lavaron las células con 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y dos veces con 1 volumen de cloroformo. En todos los lavados se recuperó la fase superior acuosa.
8. A la última fase acuosa se le añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó la mezcla durante 1 h a - 80 °C para precipitar el DNA.
9. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a velocidad máxima, 15 min y 4°C.
10. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70 % frío. Se resuspendió en 30 µL de agua MQ estéril.
11. Se cuantificó el DNA cromosómico obtenido en nanodrop (*NanoVue Plus de GE Healthcare*).

4.7.2.- Amplificación de promotores mediante PCR.

En este trabajo se utilizaron dos promotores de genes de *Anabaena sp.* Estos dos promotores se corresponden con los genes *nifJ* y *all4725* (secuencias en ANEXO Tabla 1). La mezcla de PCR se preparó añadiendo las cantidades que aparecen en la tabla 5.

Tabla 5: Composición de la mezcla de PCR para un volumen de 50 µL.

Reactivo	Volumen
Agua MQ	36.7 µL
Buffer 10X	5 µL
MgCl 2 50 mM	1.5 µL
dNTPs 2.5 mM	1 µL
<i>Primer</i> directo 10 pmol/µL	1.4 µL
<i>Primer</i> reverso 10 pmol/µL	1.4 µL
DNA genómico	2 µL
Taq polimerasa	1 µL

El programa de PCR utilizado tiene una etapa inicial de desnaturalización del DNA a 95 °C durante 1 min, seguida por 25 ciclos con una fase de 95 °C durante 30 segundos (desnaturalización), otra de 52 °C de 1 minuto (hibridación de *primers*) y una última etapa de extensión a 72 °C durante 1 minuto cada uno. La etapa de extensión final a 72 °C tiene una duración de 7 minutos. Una vez finalizado el proceso de amplificación las muestras se mantuvieron a 4 °C.

Por otro lado, las muestras amplificadas se cuantificaron en el nanodrop (*NanoVue Plus de GE Healthcare*). Posteriormente, los promotores amplificados se purificaron con el kit de purificación de DNA GE Healthcare según las indicaciones del fabricante.

5.-RESULTADOS.

5.1.- Sobreexpresión de las proteínas recombinantes.

Para la sobreexpresión de las proteínas FurB mutantes: C81A, C84A, C121A y C124A, se transformaron, mediante choque térmico, células competentes de *E.coli* BL 21 con plásmidos pET28a conteniendo el gen *furB* con cada una de las mutaciones. Las células transformadas se dejaron crecer hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{600} = 0.6-0.8$), momento en que se indujo la expresión de las proteínas mutantes con IPTG 0.8 mM durante toda la noche a 15 °C. El resultado obtenido se visualizó y analizó a través de una electroforesis desnaturalizante en gel SDS-PAGE 17 % (Figura 10).

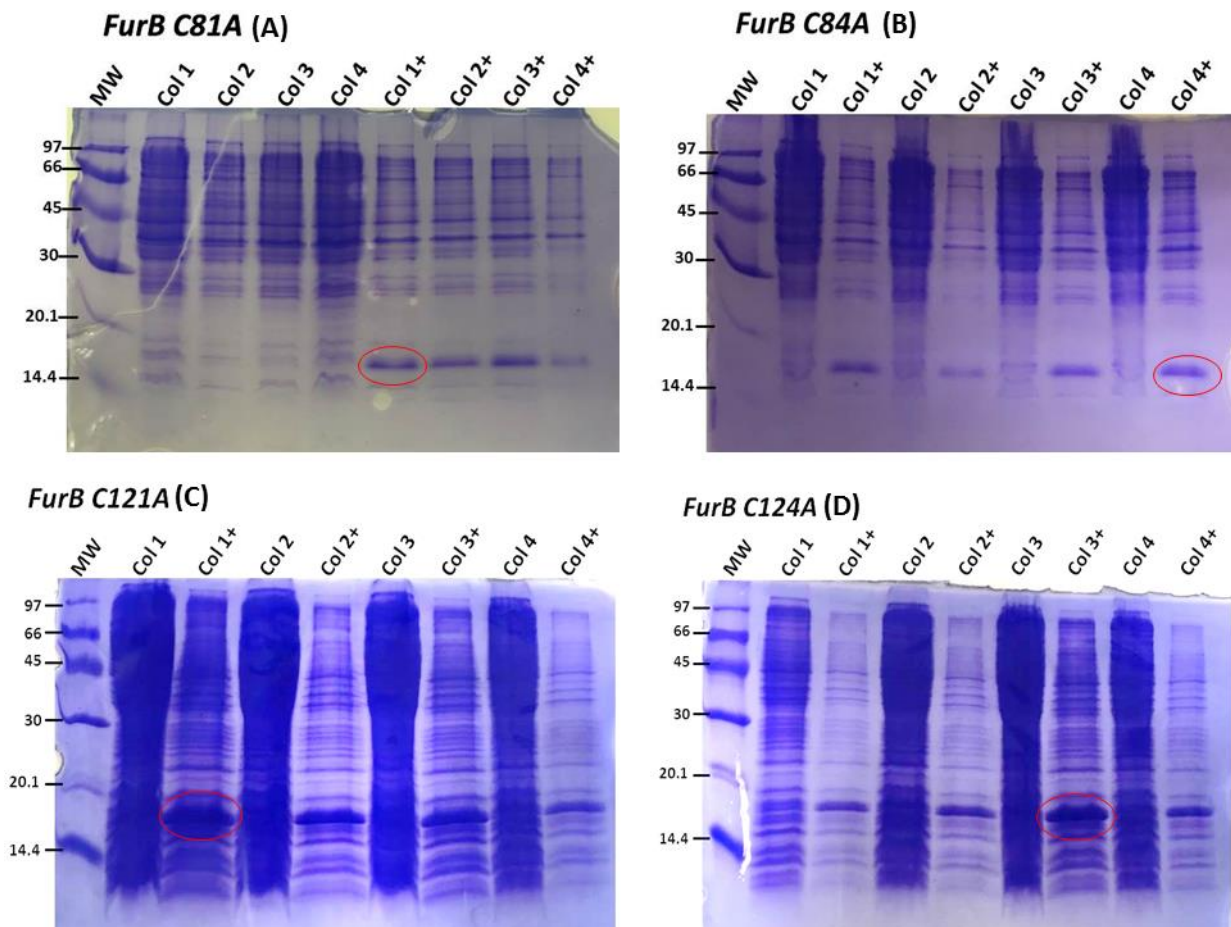


Figura 10. Sobreexpresión de las proteínas FurB C81A (A), C84A (B), C121A (C) y C124A (D) en *E.coli* BL 21. Se muestra el gel SDS-PAGE 17 % teñido con Azul de Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (*Low Molecular Weight Calibration kit*, GE Healthcare) en kDa, y el resto de carriles contienen los extractos celulares correspondientes a 1 mL de muestra de cada uno de los cultivos. La indicación + se encuentra en los carriles que contienen una muestra de cultivo inducida con 0.8 mM de IPTG O/N. Se rodea en rojo la colonia seleccionada, en cada caso, para la generación de biomasa.

Como se puede observar en la figura 10, en todos los casos las proteínas mutantes se sobreexpresaron de forma satisfactoria bajo las condiciones de cultivo utilizadas (inducción durante toda la noche con IPTG 0.8 mM a 15 °C). En todos los geles (Figura 10) se puede ver

una banda más gruesa entorno a los 17 kDa correspondiente con las proteínas mutantes FurB C81A, C84A, C121A y C124A con cola de histidinas.

Para cada una de las proteínas mutantes se seleccionó aquella colonia con una mayor sobreexpresión con el objetivo de cultivarla a gran escala, para obtener la cantidad de biomasa suficiente, que permitiera su posterior purificación. En el caso del mutante C81A se eligió la colonia 1. La colonia 4 fue la escogida en el caso del mutante C84A. Por último las colonias 1 y 3 fueron las elegidas para los mutantes C121A y C124A respectivamente.

5.2.- Purificación de las proteínas mutantes FurB C81A, C84A, C121A y C124A.

Tras haber seleccionado la colonia de mayor expresión para cada una de las proteínas mutantes, se cultivaron 5 L de medio LB/Km, por mutante, para recoger la biomasa y, así, purificar las proteínas. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad por unión a metales, en nuestro caso el zinc (IMAC-Zn²⁺), empleando un tampón de purificación con cloruro de guanidinio 2 M. A pesar de que el cloruro de guanidinio es un agente desnaturizante, en el grupo de investigación ya se había purificado, previamente, la proteína FurB nativa y fue con este tampón con el que mejores resultados se obtuvieron (Pellicer et al., 2010).

Una vez finalizada la purificación, se realizó un análisis mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 17 % de las fracciones obtenidas en el proceso, con el objeto de comprobar en cuales de ellas se encontraban las proteínas de interés (Figura 11).

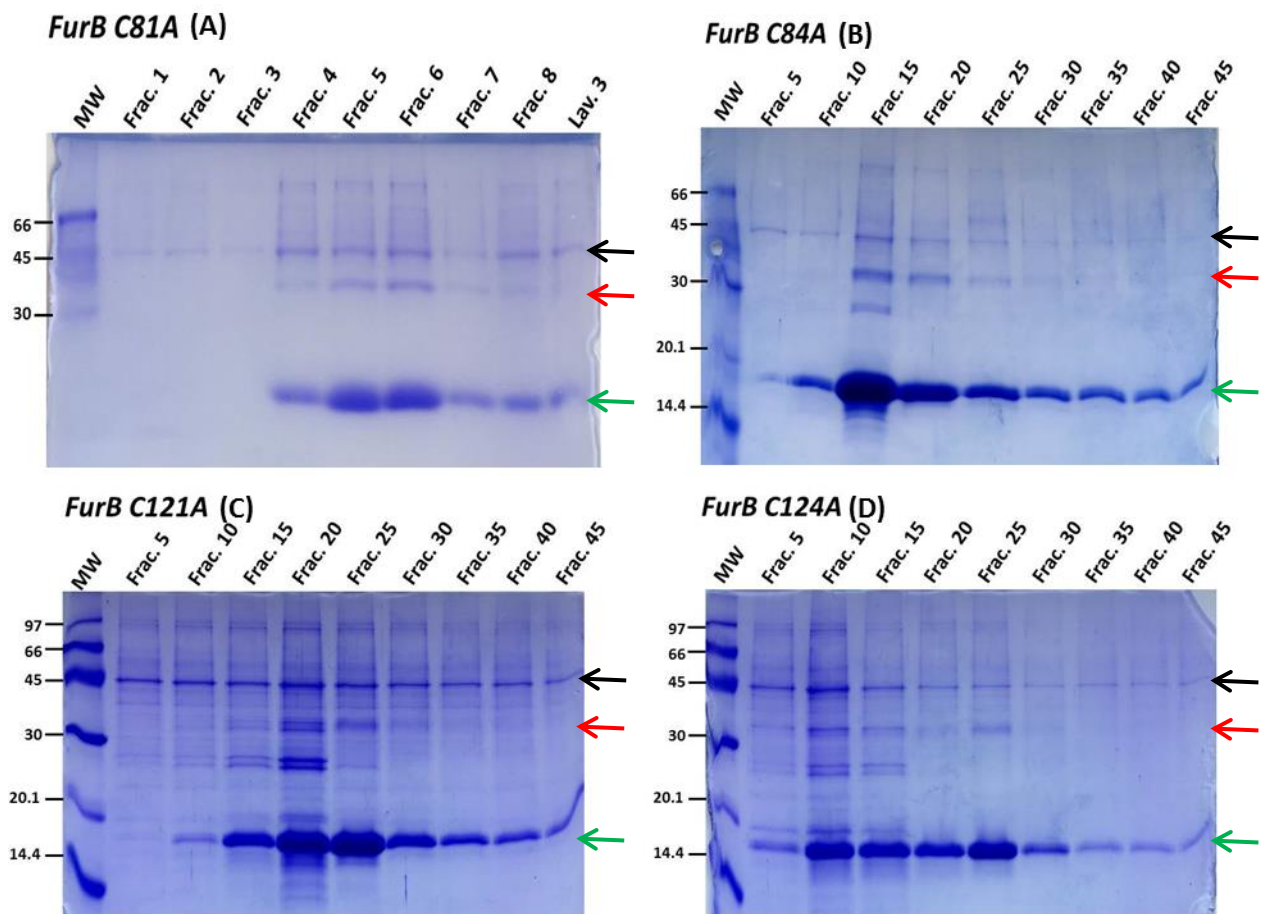


Figura 11. Fracciones eluidas de la columna de purificación para las proteínas FurB C81A (A), C84A (B), C121A (C) y C124A (D). Se muestra el gel SDS-PAGE 17 % teñido con Azul de Coomassie. Las muestras se sometieron a una electroforesis en condiciones reductoras. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (*Low Molecular Weight Calibration* kit, GE Healthcare) en kDa. Las flechas verdes corresponden a los monómeros, las rojas a los dímeros y las negras a los trímeros.

En la figura 11 se puede observar la presencia de las proteínas mutantes en las fracciones eluidas de la columna de purificación con un gradiente de imidazol (0 -1 M). En el caso del primer mutante, el C81A, se ve que la proteína aparece desde la fracción 4, siendo las fracciones 5 y 6 las que mayor concentración de la proteína poseen. En este primer caso, también, se observa que una pequeña porción de la proteína se ha perdido en el lavado (esto podría deberse a la saturación de la columna). Aun así la cantidad de proteína obtenida en este caso, y en el resto, fue suficiente para los estudios que se realizaron. Las fracciones eluidas de la columna de purificación que se muestran en el gel A (Figura 11) van de las primera a la octava, pues en un primer momento se realizó un gel con las fracciones de cinco en cinco (ANEXO Figura 4), pero sólo se vio la banda correspondiente a la proteína FurB C81A (17 kDa) en la fracción número 5, por esta razón se decidió hacer un segundo gel SDS-PAGE 17 % con las primeras fracciones (1-8) para comprobar el reparto de la proteína.

En el caso de los mutantes C84A, C121A y C124A, las proteínas se encuentran más repartidas entre las fracciones, tal y como se demuestra en los geles B, C y D de la figura 11. Las fracciones 15 y 20 son las que más cantidad de proteína mutante C84A contienen, la 20 y 25 en el caso de la C121A y, por último, las fracciones 10, 15, 20 y 25 para el mutante C124A. En todos los casos la forma mayoritaria de las proteínas es el monómero, pero en algunos casos se pueden observar lo que se considerarían dímeros e incluso trímeros, según su peso molecular.

Las fracciones con mayor proporción de proteína se juntaron (C81A: 4-9; C84A: 10-20; C121A: 15-35; C124A: 10-30), y, se dializaron en 3 L de tampón acético-acetato 10 mM pH 5.5 en frío. En los cuatro casos durante la primera diálisis la proteína precipitaba, por tanto, fue necesario someter a la proteína a 4 ó 5 cambios de tampón de diálisis para que poco a poco fuera redisolviéndose (aunque en ninguno de los casos se consiguió la redisolución completa).

Una vez dializadas las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría. Obteniendo el valor de absorbancia a 280 nm y aplicando la ley de Lambert-Beer, se obtuvieron las siguientes concentraciones: 16 μM (C81A), 19 μM (C84A), 34.4 μM (C121A) y 53.5 μM (C124A). Como en el caso de los mutantes C81A y C84A las concentraciones eran demasiado bajas, para alguno de los estudios que se llevaron a cabo posteriormente, estas proteínas se concentraron a una tercera parte de su volumen con un Amicon 3K.

5.3.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas mutantes.

5.3.1.- Determinación de la presencia de Zn^{2+} por ICP.

Para determinar de forma precisa el contenido en zinc de la proteína FurB/Zur (purificada y caracterizada por Violeta Calvo Sein-Echaluce en su Tesis Doctoral, 2016) y de los mutantes purificados en el presente trabajo, se envió una muestra de cada una de las proteínas al

Servicio de Ionómica del Instituto CEBAS-CSIC de Murcia para que fueran analizadas mediante ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*).

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación del metal zinc en las muestras de FurB nativa, C81A, C84A, C121A y C124A. Se muestran los valores de ICP (mg/L) como media de duplicados, siendo el error la desviación estándar. Las muestras con la indicación * no fueron enviadas por duplicado. La determinación se realizó sobre los moles de cada una de las proteínas indicados en la cuarta columna, llevados hasta un volumen final de 10 mL en HNO₃ de grado ICP.

Muestra	ICP Zn ²⁺ mg/L	moles Zn ²⁺	moles proteína	mol Zn ²⁺ /mol proteína
FurB WT	0.51*	7.801· 10 ⁻⁸	5.909· 10 ⁻⁸	1.32
FurB C81A	0.05 *	7.645· 10 ⁻⁹	4.112· 10 ⁻⁸	0.18
FurB C84A	0.04 ± 0	6.118· 10 ⁻⁹	2.030· 10 ⁻⁸	0.30
FurB C121A	0.095 ± 0.007	1.453· 10 ⁻⁸	1.720· 10 ⁻⁸	0.84
FurB C124A	0.06 ± 0	9.177· 10 ⁻⁹	1.605· 10 ⁻⁸	0.57

Como se puede observar en la tabla 6 la proteína FurB/Zur nativa contiene 1 mol del metal por mol de proteína monomérica, lo que confirma la existencia de un átomo de zinc estructural en la proteína purificada (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016). En el caso del mutante C81A apenas hay presencia de zinc en la proteína purificada, pues el valor obtenido es de 0.18 moles de zinc por mol de proteína. Algo muy similar ocurre con el mutante C84A, aunque en este caso la proporción de zinc es un poco más elevada (un valor de 0.30).

Al contrario que con los mutantes C81A y C84A, los mutantes C121A y C124A parece que no pierden tanta cantidad de zinc (valores de 0.84 y 0.57 moles de metal por mol de proteína respectivamente).

5.3.2.- Determinación de la actividad biológica de las proteínas mutantes por EMSA.

Mediante el ensayo de retardo en gel, EMSA, se pudo evaluar si las proteínas mutantes purificadas (C81A, C84A, C121A y C124A) eran capaces de unirse a los promotores que reconoce FurB. Como promotor específico de unión se utilizó el promotor del gen de la deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico (*all4725*), con el que previamente se había descrito una fuerte interacción (Napolitano et al., 2012), y como promotor inespecífico, es decir, al cual la proteína no es capaz de unirse se usó el promotor del gen *nifJ*. Además, todos los ensayos se realizaron en presencia de zinc y DTT para conseguir las condiciones óptimas de unión (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

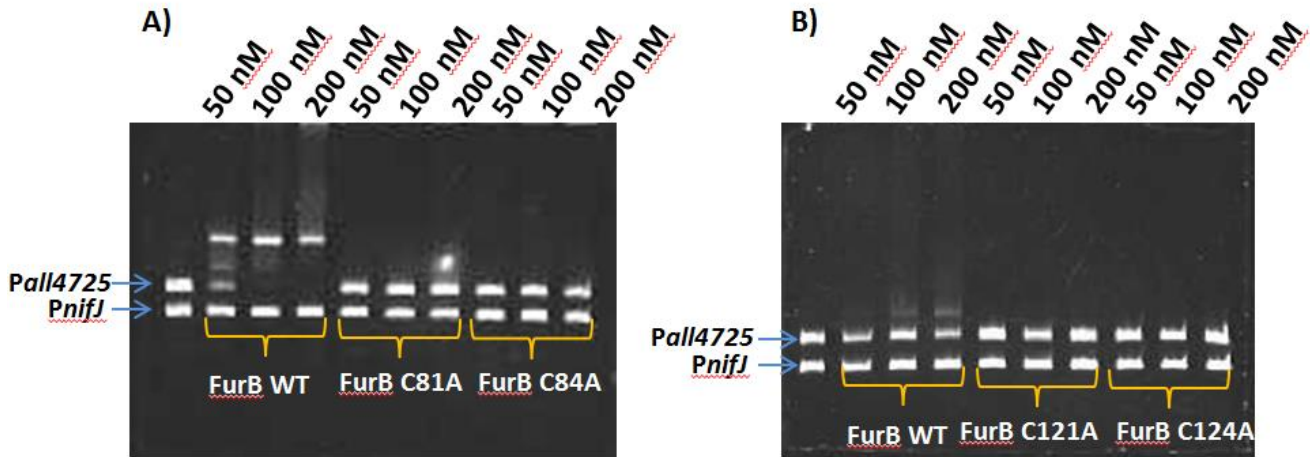


Figura 12. EMSA de las proteínas: A) FurB WT, C81A, C84A y B) FurB WT, C121A, C124A con Pall4725.

El primer carril corresponde al control negativo (sin proteína). La concentración de proteína en los demás carriles se indica sobre los mismos. En todos los casos se emplearon ZnSO₄ (5 μM) y DTT (1 mM). El promotor de *nifJ* se incluyó en todas las mezclas como promotor inespecífico-competidor.

Ninguno de los cuatro mutantes simples para los residuos de cisteína 81, 84, 121 y 124 resultaron activos *in vitro* según el ensayo de EMSA, tal y como se puede ver en la figura 12. Sin embargo, la proteína nativa es activa *in vitro*, como se puede observar en los geles A y B (Figura 12), por tanto la mutación de los residuos de cisteína provoca de alguna forma la inactivación de estas proteínas.

Cabría la posibilidad de que los mutantes del primer motivo C-X-X-C (81 y 84) no fueran activos por la pérdida del zinc (Tabla 6), en cambio los mutantes en los residuos de cisteína 121 y 124 (pertenecientes al segundo motivo C-X-X-C) no pierden tanto zinc, por ello el motivo de su inactividad no sería la pérdida del metal estructural sino otra causa.

5.3.3.- Determinación de la estructura secundaria de las proteínas mutantes por dicroísmo circular.

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que permite un análisis estructural de sustancias ópticamente activas, como las proteínas, ya que mide la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada hacia la derecha, o, hacia la izquierda. Es una técnica muy sensible que permite determinar y monitorizar cambios estructurales que se producen en las biomoléculas.

La obtención del espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano para cada una de las proteínas mutantes (C81A, C84A, C121A y C124A), y para la proteína nativa, permitió en primer lugar conocer la estructura secundaria de cada una de las proteínas estudiadas, y, por otra parte comparar todos los espectros obtenidos para ver la implicación de las mutaciones generadas en el plegamiento de las proteínas.

Como se observa en la figura 13, la proteína FurB nativa tiene un espectro característico de una conformación secundaria formada mayoritariamente por hélices-α (mínimos a 208 nm y 220 nm). Los mutantes C121A y C124A pierden por completo la estructura secundaria, mientras que los mutantes C81A y C84A la conservan pero sufren ciertos cambios en los espectros respecto al de la proteína nativa. En el caso de mutante C84A, se puede observar un

desplazamiento hacia la izquierda en el pico a 208 nm. En el mutante C81A lo que ocurre es que el pico a 208 nm tiene una mayor intensidad sin desplazarse, esto podría deberse a la estabilización de la hélice- α , tal y como se ha demostrado en otros estudios (Cabral et al., 2015).

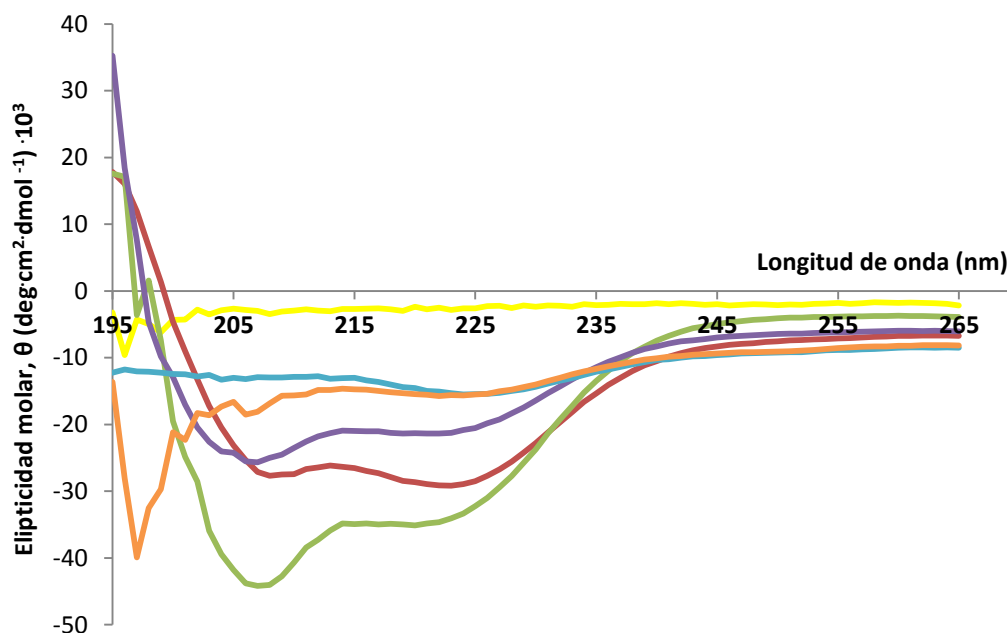


Figura 13. Espectros de dicroísmo circular – UV lejano para las proteínas FurB WT, C81A, C84A, C121A y FurB C124A. Los espectros fueron realizados a partir de muestras proteicas a una concentración de 20 μ M. El amarillo representa la absorción del tampón HAc -acetato 10 mM pH 5,5 en el que están disueltas las proteínas. La línea roja se corresponde con el espectro de la proteína FurB WT, la verde con el mutante C81A, la morada con el C84A, la azul con el C121A y la naranja con el C124A.

Al perder los mutantes C121A y C124A la estructura secundaria, tal como se ve en los espectros mostrados en la figura 13, podría ser que ésta fuera la causa por la cual no se observa actividad *in vitro* de estos dos mutantes en los ensayos de EMSA. Puesto que al no tener un correcto plegamiento, estos mutantes no serían capaces de dimerizar y generar, así, la forma activa de las proteínas capaces de unirse a los genes diana para regular su transcripción.

5.3.4- Estudios de oligomerización de las proteínas mutantes con DTT y H_2O_2 .

Para comprobar la implicación de los residuos de cisteína en la posible formación de puentes disulfuro intermoleculares que originaran la formación de complejos diméricos, trímericos, o, incluso de mayor tamaño, se trataron las proteínas con un agente reductor, como es el DTT, para garantizar la ruptura de los posibles puentes disulfuro formados, y además, se trataron con H_2O_2 para someter a las proteínas a unas condiciones oxidantes y, ver así, si bajo esta última condición las proteínas cambiaban su comportamiento (Figuras 14 y 15).

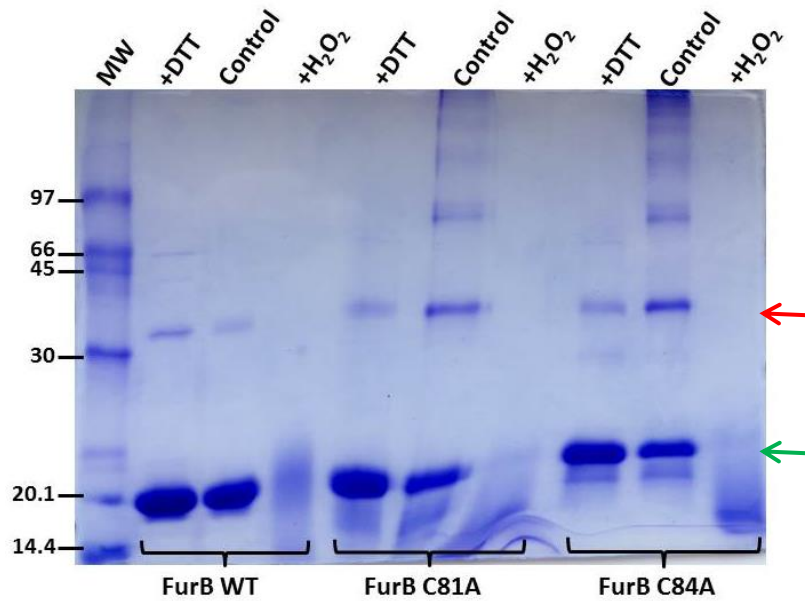


Figura 14. Análisis de oligomerización con DTT (10 mM) y H_2O_2 (1 mM) de las proteínas FurB WT, C81A y C84A. Se muestra el gel SDS-PAGE 17 % teñido con Azul de Coomassie. Las muestras se aplicaron con tampón de carga sin β -mercaptoetanol. En todos los casos se cargaron 5 μ g de proteína. La flecha verde señala la forma monomérica de las proteínas y la roja los dímeros.

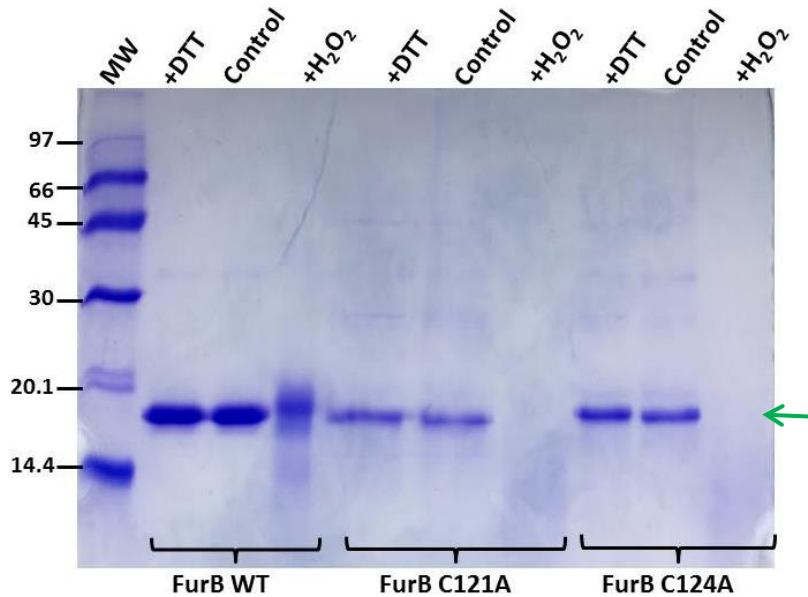


Figura 15. Análisis de oligomerización con DTT (10 mM) y H_2O_2 (1 mM) de las proteínas FurB WT, C121A y C124A. Se muestra el gel SDS-PAGE 17 % teñido con Azul de Coomassie. Las muestras se aplicaron con tampón de carga sin β -mercaptoetanol. En todos los casos se cargaron 5 μ g de proteína. La flecha verde señala la forma monomérica de las proteínas.

Como se aprecia en las figuras 14 y 15, tanto la proteína FurB nativa como los mutantes C121A y C124A se encuentran mayoritariamente en forma monomérica en los controles (sin agente reductor ni oxidante); sin embargo, los mutantes C81A y C84A además de la forma monomérica presenta dímeros e incluso complejos de mayor tamaño en los controles. Al añadir el DTT no se observan cambios significativos en la proteína nativa y los mutantes C121A y C124A, en cambio, esos complejos de gran tamaño desaparecen, y la proporción de dímeros disminuye en los mutantes C81A y C84A. Estos resultados podrían indicar que, al mutar esos

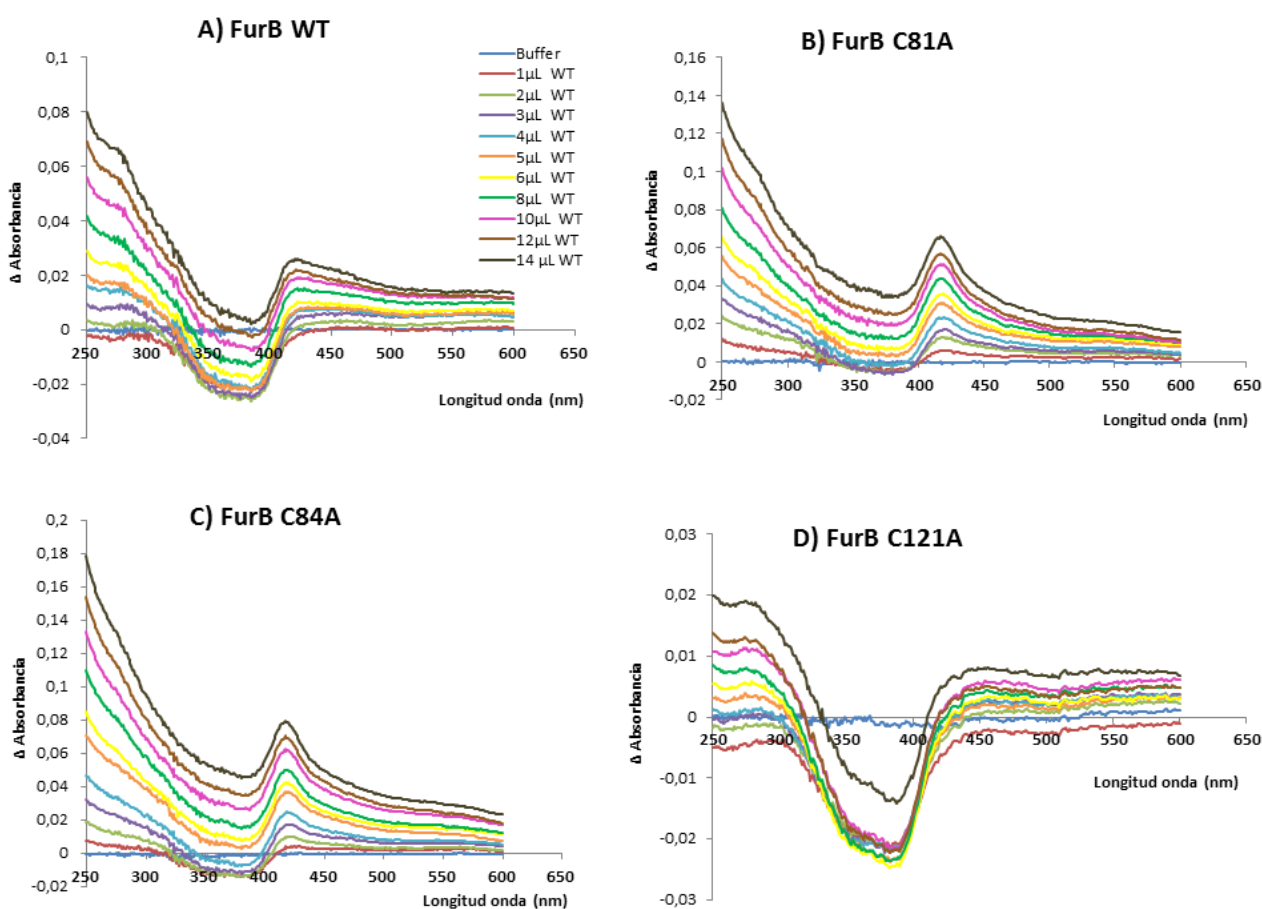
residuos la cisteína que queda libre en el motivo C-X-X-C podría ser más reactiva y tendría la posibilidad de establecer contacto con otras moléculas para formar complejos. Al añadir un oxidante, en todos los casos se ve que las proteínas se degradan. Esto podría estar indicando que las mutaciones en los residuos de cisteína conducen a una desprotección de las mismas, bien sea porque pierden el metal o porque el agente oxidante utilizado (H_2O_2) lo desplaza, de forma que quedan expuestas a la oxidación y, con ello a la degradación.

5.3.5- Ensayos de unión al grupo hemo.

Con este ensayo se pretende conocer si las mutaciones realizadas sobre la proteína FurB en los residuos de cisteínas que forman parte de los motivos C-X-X-C alteran de alguna forma la capacidad de dicha proteína para unirse al grupo hemo.

Aunque a priori el motivo considerado de unión al grupo hemo Cys (93)-Pro-Val no se ve alterado en los mutantes generados en el presente trabajo, es posible que de alguna manera estas mutaciones puedan afectar a la interacción del grupo hemo con la proteína FurB.

Se llevaron a cabo espectros diferenciales con las proteínas FurB WT, C81A, C84A, C121A y C124A siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16.



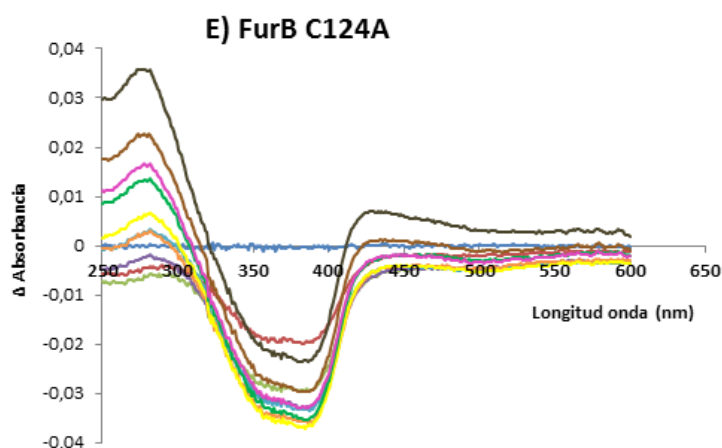


Figura 16. Superposición de los espectros diferenciales de las proteínas FurB WT (A), C81A (B), C84A (C), C121A (D) y C124A (E) con hemo. Se muestra el cambio generado en el espectro por la adición de concentraciones crecientes de proteína sobre la solución 2 μM de hemo. En la leyenda se indican los volúmenes añadidos. En todos los casos de muestra el espectro nombrado como *buffer* que se corresponde al blanco (0 μL de proteína) y el resto de espectros hasta alcanzar la saturación. El ensayo se realizó a temperatura ambiente en Tris-HCl 50 mM pH8.

Como se puede observar en la figura 16, todas las proteínas interaccionan en mayor o menor medida con el grupo hemo, pues en los espectros se observa un mínimo a 384 nm correspondiente con el grupo hemo libre, y un máximo entorno a 420 nm provocado por el grupo hemo coordinado. El valor máximo de $\Delta\text{Abs}_{420-384}$ fue muy similar en todas las proteínas, siendo un poco menor en el caso del mutante C121A, lo que sugiere que existe una menor afinidad del grupo hemo en este mutante.

Para comprobar la fortaleza de la interacción con el grupo hemo, los valores de $\Delta\text{Abs}_{420-384}$ obtenidos tras cada una de las adiciones se representaron frente a la concentración de proteína (Figura 17).

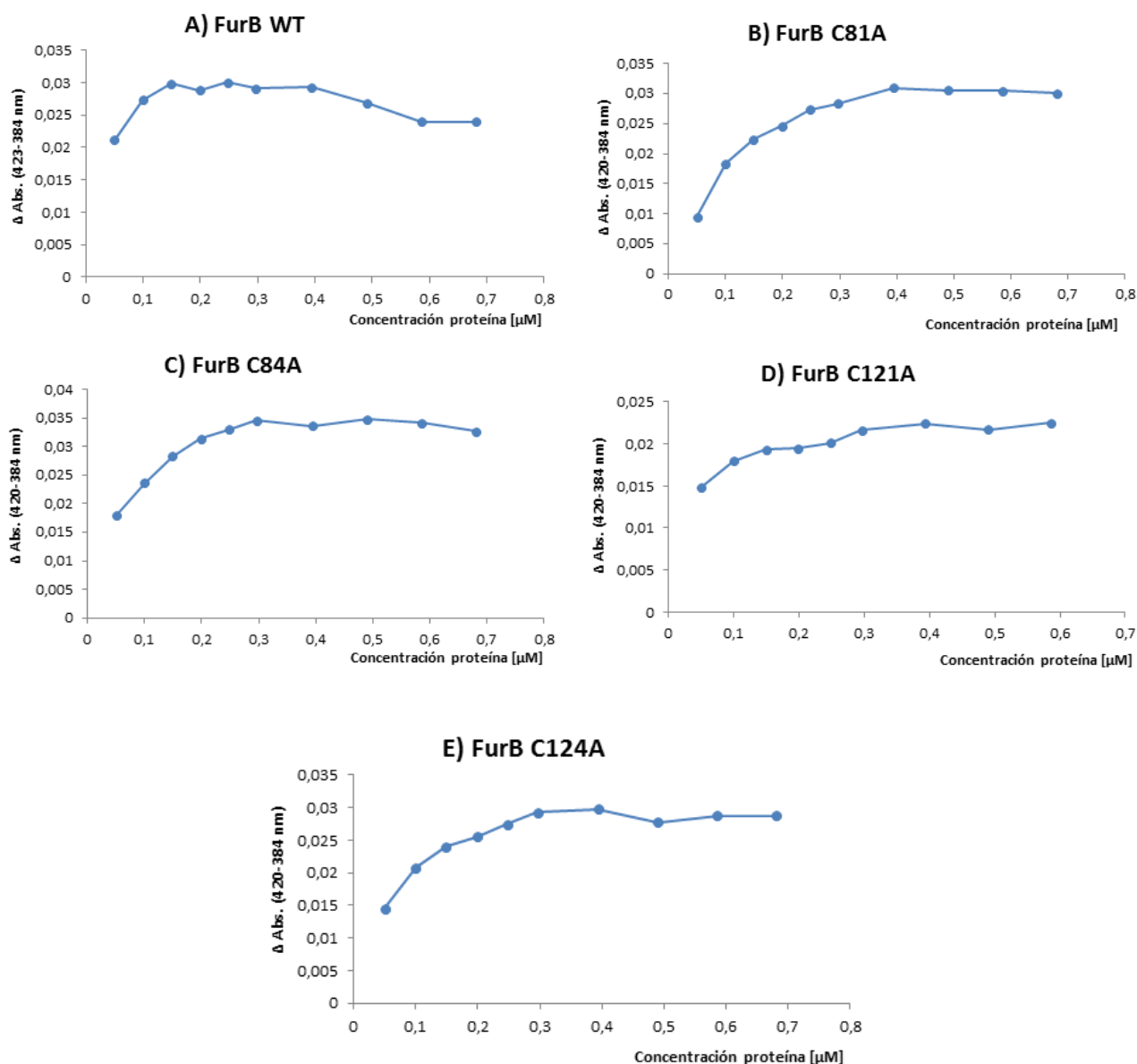


Figura 17. Curvas de saturación por unión al grupo hemo de las proteínas FurB WT (A), C81A (B), C84A (C), C121A (D) y C124A (E) con hemo. Se muestran los valores de $\Delta Abs_{420-384}$ obtenidos por el cambio generado en el espectro debido a la adición de concentraciones crecientes de proteína sobre la solución 2 μ M de hemo.

Los valores representados en las gráficas de la figura 17, trataron de ajustarse a una ecuación que representa la curva de saturación de un complejo hemo-proteína con una estequiometría 1:1, de acuerdo con la siguiente ecuación y utilizando el programa KaleidaGraph:

$$\Delta Abs = \frac{\varepsilon \cdot l \cdot (F + L + K_d)}{2} - \frac{\varepsilon \cdot l \cdot \sqrt{(F + L + K_d)^2 - 4 \cdot F \cdot L}}{2}$$

En la ecuación anterior, ε es el coeficiente de extinción molar del grupo hemo, K_d la constante de disociación del complejo hemo-proteína, l la longitud de la cubeta, F la concentración de

proteína en cada momento (FurB WT, C81A, C84A, C121A y C124A), y, L la concentración del grupo hemo en cada momento.

A pesar de que se obtienen curvas hiperbólicas que llegan a la saturación en todos los casos, ninguno de los datos pudo ajustarse a la ecuación de estequiometría 1:1 para obtener la constante de disociación del complejo hemo-proteína .

6.-DISCUSIÓN.

6.1.- Purificación de las proteínas mutantes.

En el presente trabajo se han purificado cuatro proteínas mutantes (C81A, C84A, C121A y C124A) por cromatografía de afinidad a metal (IMAC-Zn²⁺) utilizando un tampón de purificación con cloruro de guanidinio, que en trabajos previos había dado buenos resultados en la purificación de proteínas Fur (Pellicer et al., 2010).

El método usado para la purificación de las proteínas ha resultado eficaz, pues en los cuatro casos se ha obtenido proteína en cantidad suficiente y a una concentración adecuada para realizar los ensayos posteriores de caracterización.

6.2.- Caracterización bioquímica y actividad biológica de las proteínas mutantes.

6.2.1.- Contenido en zinc de las proteínas FurB mutantes.

Como la proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120 todavía no ha sido cristalizada, un modelo estructural de la misma (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016), junto con el hecho de que existe una alta conservación de los residuos de cisteína de los motivos C-X-X-C entre las distintas proteínas FurB de distintos organismos (ANEXO Figura 3), permitieron sugerir que los residuos de cisteína 81, 84, 121 y 124 de la proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120 se encontraban formando parte de un entorno tetraédrico capaz de coordinar la unión del metal estructural, que en este caso se trata del zinc (Fillat, 2014).

Los resultados obtenidos en la cuantificación del zinc por ICP-MS en las proteínas mutantes para los residuos de cisteína citados anteriormente, mostraron que los mutantes en cisteínas del primer motivo C-X-X-C (C81A y C84A) pierden una gran proporción del metal zinc, en cambio los mutantes del segundo motivo (C121A y C124A) no pierden apenas zinc en comparación con los anteriores. Estos resultados permiten concluir que los residuos de cisteína 81 y 84 podrían estar implicados en la coordinación metal estructural en la proteína FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120; sin embargo, la participación de los residuos de cisteína 121 y 124 en la coordinación del metal estructural no estaría tan clara como en un principio se pensaba en base al modelo estructural generado (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016). Para salir de dudas en el futuro se podrían hacer estudios con proteínas dobles mutantes para los residuos de cisteína de los motivos C-X-X-C, o incluso se podría tratar de optimizar las condiciones de cristalización de la proteína nativa o las proteínas mutantes para tratar de dilucidar de forma más clara y precisa la implicación de estos residuos en la coordinación del zinc (hay que destacar que en el grupo de investigación se han realizado varios intentos para tratar de cristalizar la proteína FurB/Zur nativa, pero no se ha conseguido).

Para confirmar los resultados obtenidos en el análisis de ICP-MS, dado que las proteínas tienen una cola de histidinas que podría afectar a la unión del metal, habría que repetir dicho análisis eliminando, previamente, las colas de histidinas.

6.2.2.- Actividad biológica *in vitro* de las proteínas FurB mutantes.

Estudios previos demostraron que la proteína recombinante FurB/Zur de *Anabaena sp.* PCC 7120 purificada con cloruro de guanidinio era biológicamente activa, pues era capaz de unirse al promotor del gen de la deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico (*all4725*) en presencia de zinc y DTT (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

Los mutantes generados en el presente trabajo, al perder uno de los residuos de cisteína considerados como los responsables de la coordinación del zinc estructural en la proteína, podrían ser inactivos en los ensayos *in vitro* de EMSA con el promotor del gen *all4725*, si estos residuos estuvieran implicados en el motivo de unión al DNA y/o de dimerización. Los cuatro mutantes C81A, C84A, C121A y C124A son biológicamente inactivos *in vitro*, es decir, han perdido la capacidad de unirse al DNA. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los mutantes del primer motivo C-X-X-C (C81A y C84A) han perdido el zinc, y cómo la presencia del mismo es esencial para que la proteína FurB/Zur sea activa, esta pérdida conduce a la inactividad biológica *in vitro* de los mismos. En cambio los mutantes C121A y C124A (pertenecientes al segundo motivo C-X-X-C) no pierden zinc pero tampoco son activos, por tanto la pérdida del zinc parece no ser el motivo de su inactividad biológica *in vitro*, sino que, otra causa debe ser la responsable de la pérdida de su unión al DNA.

Una posible razón, aparte de la pérdida del metal, para que las proteínas no sean activas frente a un DNA diana, es que no tengan la estructura adecuada que les permita modular esta unión.

Los espectros de dicroísmo circular obtenidos, en el presente trabajo, en la región del UV-lejano, demuestran que los mutantes C121A y C124A pierden por completo su estructura secundaria, por lo tanto, este podría ser el motivo por el que estos mutantes no son biológicamente activos *in vitro* en los ensayos de EMSA. En el caso de los mutantes C81A y C84A, los espectros no muestran pérdida de estructura secundaria (aunque sí una ligera modificación de la misma), por tanto, tal y como se ha mencionado probablemente estos mutantes pierden actividad por la ausencia de zinc estructural.

6.2.3.- Oligomerización de las proteínas FurB mutantes.

Para ver la implicación de los residuos de cisteína de los motivos C-X-X-C en la posible formación de puentes disulfuro intermoleculares, que dieran lugar a la formación de dímeros o trímeros, las proteínas mutantes fueron sometidas a condiciones reductoras u oxidantes.

En condiciones reductoras (se utilizó DTT como agente reductor) las proteínas mutantes C121A y C124A, así como la proteína nativa, no sufrían cambios significativos en la formación de dímeros o trímeros respecto al control (sin agente reductor). Estos resultados sugieren que los residuos de cisteína 121 y 124, probablemente estén formando un puente disulfuro intracatenario en la proteína nativa, y, al mutar cualquiera de las dos cisteínas del segundo motivo C-X-X-C éstas queden reducidas pero sin capacidad de reaccionar con residuos pertenecientes a otras moléculas de proteína. El caso de los mutantes C81A y C84A (primer motivo C-X-X-C) es diferente, pues en condiciones reductoras se pierden complejos de gran tamaño, así como, los dímeros y trímeros que se forman en la muestra control. Esto indica que

al mutar uno de estos residuos la cisteína que queda formando parte del motivo C-X-X-C sería muy reactiva y podría ser capaz de interactuar con los residuos de otras moléculas de proteína, provocando, así, la formación de complejos proteicos de mayor tamaño.

Por otra parte, en condiciones oxidantes (se usó el H_2O_2 como agente oxidante) todas las proteínas mutantes y nativa se degradaban. En muchas ocasiones el metal, en este caso el zinc, protege a los residuos de cisteína de la oxidación y, es posible que los mutantes C81A y C84A al perderlo dejen expuestos estos residuos de forma que podrían oxidarse y generar diferentes tipos de óxidos que condujeran a la proteólisis de estas proteínas. En el caso de las proteínas FurB/Zur nativa, C121A y C124A lo que podría estar ocurriendo, ya que éstas no pierden a priori el zinc (aunque trabajos previos del grupo de investigación han demostrado que no todas las moléculas de proteína FurB nativa contienen zinc), es que el H_2O_2 desplazara al metal y esto condujera a la situación anterior de exposición de los residuos de cisteína a la oxidación.

Además, para tratar de aportar más información sobre el tema se realizaron dos ensayos diferentes de determinación de grupos $-SH$ libres mediante las técnicas de espectroscopia con DTNB y electroforesis con AMS. A pesar de que fueron varios los intentos, lamentablemente todos ellos fueron infructuosos, por ello en el futuro se llevarán a cabo otras técnicas, como por ejemplo, la alquilación pero con un agente alquilante diferente al probado (AMS).

Todos estos resultados están en concordancia con lo discutido en apartados anteriores sobre la posible participación de los residuos de cisteína 81 y 84 en la coordinación del zinc estructural. En cambio es muy posible que los residuos 121 y 124 no participen en esta coordinación del zinc, por tanto, serán otros los residuos que junto con los residuos de cisteína 81 y 84 estén implicados en la formación del entorno tetraédrico necesario para la coordinación del metal (Fillat, 2014). Es probable que estos otros residuos implicados en la coordinación del zinc sean algunos de los residuos de histidinas que tiene la proteína FurB/Zur, puesto que en estudios previos de modelado estructural se ha confirmado que alguno de ellos como la His77, His96, His100, His113 o His123 tendrían una alta probabilidad de estar implicados en la coordinación de un átomo de zinc en un sitio regulador (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

6.2.4.- Unión de las proteínas FurB mutantes al grupo hemo.

La proteína FurB/Zur *Anabaena sp.* PCC 7120 contiene en su secuencia el motivo Cys (93)-Pro-Val considerado como motivo de unión al grupo hemo, además, estudios previos realizados en el grupo de investigación demostraron la capacidad de la proteína FurB/Zur nativa de interactuar con el grupo hemo (López-Gomollón et al., 2009), y, que la mutación de la cisteína 93 disminuía la afinidad en la unión hemo-proteína (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

A pesar de que los mutantes generados en el presente trabajo, en principio no estarían implicados en el sitio de unión del grupo hemo, se realizó este ensayo para comprobar si las mutaciones introducidas afectaban a dicha interacción y, sí procedía intentar ajustar los datos obtenidos a una ecuación que representa la curva de saturación de un complejo hemo-proteína con una estequiometría 1:1, similar a la que presenta el parálogo FurA (Hernández et

al., 2004). Cabe destacar que en los estudios realizados previamente con FurB/Zur los datos obtenidos no se pudieron ajustar (Tesis Doctoral Violeta Calvo Sein-Echaluce, 2016).

En nuestro caso observamos que todos los mutantes interaccionan con el grupo hemo de forma similar. Se observa un máximo a una longitud de onda de 420 nm y un mínimo a 384 nm. Con los datos obtenidos de la espectroscopia diferencial se obtienen curvas hiperbólicas de saturación, pero al tratar de ajustar estos datos a la ecuación correspondiente, no se obtienen valores de la constante de disociación (K_d) del complejo hemo-proteína fiables, tal y como ocurría en los estudios previos. A pesar de la imposibilidad de ajustar los datos, con las representaciones obtenidas se podría realizar una estimación en la cual el valor de la K_d estaría en el rango μM .

Como las proteínas mutantes purificadas en el presente trabajo tienen una cola de histidinas en su extremo N-terminal, es posible que este hecho pueda estar afectando a los datos obtenidos y, por tanto, al ajuste posterior. Por ello, estos ensayos deberían repetirse con proteínas a las que se les hubiera cortado la cola de histidinas.

Por otro lado, si las curvas obtenidas en los ensayos realizados con proteínas sin cola de histidinas no son satisfactorias se podría tratar de hacer esta determinación mediante un estudio de calorimetría de titulación isoterma, ITC. Ya que ha dado buenos resultados en otros trabajos similares llevados a cabo en nuestro laboratorio.

7.-CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La purificación mediante cromatografía de afinidad a metal (IMAC-Zn²⁺) empleando cloruro de guanidinio permite obtener las proteínas mutantes FurB C81A, C84A, C121A y C124A en cantidad suficiente para su caracterización.
- Las proteínas FurB C81A y C84A no tienen zinc (0.18 y 0.30 mol Zn²⁺/ mol proteína), mientras que, las proteínas FurB C121A y C124A contienen 0.84 y 0.57 mol Zn²⁺/ mol proteína de carácter estructural.
- Ninguno de los cuatro mutantes es activo *in vitro* según los ensayos de EMSA.
- Los mutantes FurB C121A y C124A pierden por completo su estructura secundaria.
- Los mutantes FurB C81A y C84A mantienen su estructura secundaria, en la que predomina el contenido en hélices α , aunque al introducir la mutación ésta se ve un poco alterada.
- La forma principal de los cuatro mutantes es un monómero, siendo los mutantes C81A y C84A capaces de formar complejos proteicos de mayor peso molecular (dímeros, trímeros y superiores).
- Bajo condiciones reductoras los mutantes C81A y C84A disminuyen su capacidad para formar complejos proteicos. En cambio el patrón de oligomerización de los mutantes C121A y C124A no sufre alteraciones.
- En condiciones oxidantes todos los mutantes sufren degradación.
- Todos los mutantes generados (C81A, C84A, C121A y C124A) son capaces de interactuar con el grupo hemo.

CONCLUSIONS.

- *The purification by zinc affinity chromatography with guanidinium chloride allows obtain enough amount of mutant proteins FurB 81A, C84A, C121A y C124A for their characterization.*
- *FurB C81A and C84A mutant proteins dot not contain strucutral zinc (0.18 and 0.30) while FurB C121A and C124A proteins contain zinc (0.84 and 0.57).*
- *All mutant proteins are inactive in vitro.*
- *FurB C121A and C124A mutant proteins lost their secondary structure.*
- *FurB C81A and C84A mutant proteins maintain their secondary structure, although the mutation causes alterations in secondary structure.*
- *All FurB mutant proteins are in monomeric form but only FurB C81A and C84A proteins are able to form dimers, trimers and other protein complexes.*
- *Under reducing conditions C81A and C84A mutant proteins have low capacity to form protein complexes, in contrast C121A and C124A mutant proteins, whose oligomerization patterns do not change.*
- *Oxidizing conditions degrade all mutant proteins.*
- *All mutant proteins (C81A, C84A, C121A and C124A) are able to interact with heme.*

8.- BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, D. G. and P. S. Duggan (1999). "Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria." *New Phytologist* 144: 3-33.
- Andrews, S. C. et al., (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiology Reviews* 27(2-3): 215-237.
- Aud, D. S. (2001). "Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites" *BioMetals* 14: 271-313.
- Botello-Morte, L. et al., (2014). "Unraveling the redox properties of the global regulator FurA from *Anabaena sp.* PCC 7120: disulfide reductase activity base don its CXXC motifs." *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (9): 1396-1406.
- Botello-Morte, L. et al., (2016). "Cysteine mutational studies provide insight into a thiol-based redox switch mechanism of metal and DNA binding in FurA from *Anabaena sp.* PCC 7120." *Antioxidants & Redox Signaling* 24 (4): 173-185.
- Cabral, K. et al., (2015). "Biophysical studies on BEX3, the p75NTR-associated cell death executor, reveal a high-order oligomer with partially folded regions." *PloS ONE* 10 (9): 1-23.
- Carr, N. G. et al., (1982). "The biology of cyanobacteria." University of California Press.
- Drews, G. and J. Weckesser (1982). "Function, structure and composition of cell walls and external layers." *The biology of cyanobacteria.* N.G. Carr and B. A. Whitton. Oxford, Blackwell Scientific 19: 333-356.
- Fillat, M. F. (2014). "The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators." *Arch Biochem Biophys* 546: 41-52.
- Flores, E. and A. Herrero (2010). "Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria." *Nature Reviews Microbiology* 8(1): 39-50.
- González, A. et al., (2012). "FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena sp.* PCC 7120." *Environmental Microbiology* 14(12): 3175-3187.

- Hernández, J. A. et al., (2002). "Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state." *Biochemical Journal* 336: 315-322.
- Hernández, J. A. et al., (2004). "Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition." *FEMS Microbiology Letters* 236(2): 275-282.
- Hernández, J. A. et al., (2006). "Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters." *BioMetals* 19: 259-268. 31
- Herrero, A. et al., (2001). "Nitrogen control in cyanobacteria." *Journal of Bacteriology* 183 (2): 411-425.
- Lee, J.W. and J. D. Helmann (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." *BioMetals* 20(3-4): 485-499.
- López-Gomollón, S. et al., (2007). "Expression of furA is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocyst of *Anabaena* sp. PCC 7120" *Microbiology* 153: 42-50.
- López-Gomollón, S. et al., (2009). "New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress." *Biochemical Journal* 418(1): 201-207.
- Napolitano, M. et al., (2012). "Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." *Journal of Bacteriology* 194(10): 2426-2436.
- Pellicer, S. et al., (2010). "High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment." *Process Biochemistry* 45(2): 292-296.
- Rippka, R. et al., (1978). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- Sein-Echaluce et al., (2015) "Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120." *Environmental Microbiology* 17(6): 2006–2017.

- Sein-Echaluce, V. (2016). Tesis Doctoral: “Estudio funcional de la proteína FurB (Zur) de *Anabaena* sp. PCC 7120: caracterización bioquímica e implicación en la respuesta a estrés oxidativo.” Universidad de Zaragoza.
- Stanier, G. (1988). “Fine structure of Cyanobacteria.” *Methods in Enzymology*. L. Packer and A. N. Glazer, Academic Press 167.
- van de Meene, A. et al., (2006). “The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.” *Archives of Microbiology* 184: 259-270.
- Xiong, J. and C.E. Bauer (2002) “Complex evolution of photosynthesis.” *Annual Review of Plant Biology* 53: 503-521.
- Yingping, F. et al., (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.” *Environmental Microbiology Reports*.