



**Bioquímica y Biología
Molecular y Celular**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Rol de FurC en *Anabaena sp.* PCC 7120

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Dirigido por María F. Fillat

Curso 2011/2012



ESTHER BROSET BLASCO

Máster en Biología Molecular y Celular

Rol de FurC *Anabaena* sp. PCC 7120

RESUMEN

La proteína FurC es una de las tres proteínas de la familia Fur (Ferric Uptake Regulator) que posee *Anabaena* sp. PCC 7120. Esta familia de proteínas es la encargada de regular la homeostasis del hierro, aunque también se ha visto que son capaces de realizar otras funciones. En concreto FurA modula la respuesta de la cianobacteria al estrés oxidativo y FurB se une inespecíficamente al DNA para protegerlo del daño oxidativo. Sin embargo, FurC es la menos conocida y por ello este trabajo consiste en realizar un estudio de su papel.

Para la realización de este trabajo se ha obtenido un mutante de *Anabaena* sp. 7120 que sobreexpresa FurC (EB2770FurC). También se ha analizado la transcripción de *furC* en un cultivo de *Anabaena* WT a distintos tiempos después de retirar el nitrógeno del medio. Y se ha realizado un ensayo de pull-down para determinar a qué proteínas se une FurC.

Los resultados fueron que la transcripción de *furC* se activa en déficit de nitrógeno y que FurC se une a dos proteínas linker que forman parte de los ficobilisomas de *Anabaena*. Por otro lado, los estudios con el mutante de sobreexpresión de FurC revelaron que EB2770C posee un mayor ratio de ficobiliproteínas/proteínas totales en presencia o ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Con estos resultados se ha propuesto un modelo de acción de FurC. Este modelo propone que un déficit de ficobiliproteínas aumenta la expresión de FurC, que actúa uniéndose a los ficobilisomas y estabilizándolos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las cianobacterias.....	1
1.1.1. Clasificación	1
1.1.2. Características generales	1
1.1.3. Diferenciación celular y metabolismo de nitrógeno	2
1.1.4. Ficobilisomas	3
1.2. <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	4
1.3. La familia de proteínas Fur	4
1.3.1. Características generales de las proteínas Fur	4
1.3.2. Función y mecanismos de regulación de Fur	5
1.4. La proteína FurC de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Técnicas de cultivo y cepas empleadas.....	8
3.2. Manipulación de ácidos nucleicos	9
3.2.1. Extracción de RNA.....	10
3.2.2. Extracción de DNA genómico de <i>Anabaena</i> sp. para PCR de colonia	11
3.2.3. Retrotranscripción semicuantitativa (RT-PCR).....	11
3.3. Métodos genéticos.....	12
3.3.1. Transformación mediante choque térmico en <i>E.coli</i>	12
3.3.2. Conjugación triparental en <i>Anabaena</i> PCC 7120.....	12
3.4. Manipulación de proteínas	13
3.4.1. Purificación de FurC-GST y GST.....	13
3.4.2. Extracción de proteínas totales de <i>Anabaena</i> sp. 7120.....	14
3.4.3. Dot-blot.....	14
3.4.4. Ensayo de Pull-down.....	15
3.5. Métodos analíticos.....	16
3.5.1. Determinación de clorofila.....	16
3.5.2. Determinación de carotenoides	17
3.5.3. Determinación de ficobiliproteínas	17

3.5.4.	Determinación de proteínas totales	17
3.6.	Microscopía	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1.	Análisis de la transcripción de <i>furC</i> en deficiencia de nitrógeno	18
4.2.	Ensayo de pull-down	19
4.3.	Obtención del mutante de sobreexpresión de FurC en <i>Anabaena sp</i> PCC 7120.	21
4.3.1.	Conjugación triparental	21
4.3.2.	Comprobación de la sobreexpresión de FurC	23
4.4.	Caracterización del mutante EB2770FurC	24
4.4.1.	Curva de crecimiento	24
4.4.2.	Comportamiento en deficiencia de nitrógeno	28
4.4.3.	Análisis de la transcripción de <i>HetR</i> y <i>NtcA</i>	33
4.5.	Modelo de acción de FurC	34
5.	CONCLUSIONES.....	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las cianobacterias

1.1.1. Clasificación

Las cianobacterias anteriormente clasificadas como algas, ahora constituyen uno de los reinos *Bacteria*. En cuanto a su significado evolutivo se piensa que estos microorganismos fueron los primeros seres que, siendo aerobios, contribuyeron, gracias a la fotosíntesis, a la formación de la actual atmósfera oxigénica. Por otra parte, las cianobacterias ejercieron un papel fundamental en el desarrollo de los eucariotas fotosintéticos porque son los precursores de los cloroplastos.

Su forma de división y su morfología son muy variadas. Atendiendo a esto se pueden clasificar en cinco secciones (Cavalier-Smith 2002):

- I. Chroococcales: Unicelulares aisladas o agregados celulares que se dividen por fisión binaria o gemación
- II. Pleurocapsales: se reproducen por formación de pequeñas células esféricas llamadas baeocitos producidos por fisión múltiple.
- III. Oscillatoriales: filamentosas que se dividen por fisión binaria en un plano único no formadoras de heterocistos (especializadas en la fijación de nitrógeno)
- IV. Nostocales: células filamentosas que producen heterocistos, como *Anabaena* utilizada en este trabajo.
- V. Stigonematales: células filamentosas formadoras de heterocistos y ramificaciones.

1.1.2. Características generales

Las características más importantes de las cianobacterias son:

- Tamaño variable, desde el típico de una bacteria (0,5-1 μm) hasta unos 60 μm .
- Pared celular similar a la de las bacterias Gram negativas. Algunas producen envueltas de mucina, vainas, etc., que reúnen a muchas células o filamentos.
- Fotótrofas obligadas, aunque algunas especies asimilan compuestos orgánicos como glucosa y acetato en presencia de luz y otras lo pueden hacer sin luz (Stal & Moezelaar, 1997).
- Muchas pueden producir neurotoxinas como las microcistinas.
- Sólo poseen una clase de clorofila, la clorofila a.
- Poseen pigmentos fotosintéticos (ficobilinas), que se asocian con ficobiliproteínas formando los ficobilisomas. Estos ficobilisomas actúan uniéndose al fotosistema II

(por la parte externa del tilacoide) para captar la energía luminosa ejerciendo como antenas.

- Algunas especies toleran muy bien los ambientes extremos.
- Muy ubicuas, existen prácticamente en todos los suelos y aguas.
- Son muy eficaces en el establecimiento de relaciones simbióticas, sobre todo con líquenes protozoos y hongos. Además, las que fijan nitrógeno forman asociaciones con diversas plantas.

1.1.3. Diferenciación celular y metabolismo de nitrógeno

Como se ha dicho, algunas son capaces de diferenciarse formando hormogonios, akinetos o heterocistos en respuesta a cambios ambientales.

- Los **hormogonios** son cadenas cortas y pequeñas, poseen vacuolas y por ello pueden moverse flotando para colonizar zonas más iluminadas, por el contrario no pueden fijar nitrógeno. El desarrollo de hormogonios se produce en respuesta al déficit de nutrientes o de iluminación. Son la forma infectiva de la cianobacteria por lo que pueden ser importantes en el proceso de simbiosis.
- Los **akinetos** son células grandes con gruesa pared celular y abundantes gránulos de reserva. Se forman ante malas condiciones ambientales como la baja temperatura o falta de energía. Actúan como formas de resistencia y pueden volver a germinar ante condiciones favorables. Sólo las cianobacterias formadoras de heterocistos pueden desarrollar los akinetos; se cree que los heterocistos se forman a partir de los akinetos (Meeks & Elhai, 2002).
- Los **heterocistos** se diferencian en ausencia de nitrógeno combinado. (**Figura 1.1.3.**) En ellos se lleva a cabo la fijación de N_2 atmosférico gracias a la nitrogenasa que lo reduce a NH_4^+ . Como esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno, en estos heterocistos se crea un ambiente microaerobio (Golden & Yoon, 2003) que permite esta fijación. Para la creación de este entorno se forman gruesas envueltas celulares que impiden la difusión de gases, la pérdida del fotosistema II que evita el desprendimiento de oxígeno fotosintético y expresión de superóxidodismutasa que elimina radicales resultantes de la reducción del oxígeno en el fotosistema I. Los heterocistos también tienen débil pigmentación por degradación de ficobiliproteínas que se usan como precursores para la síntesis proteica. Además, el heterocisto maduro carece de ribulosa bisfosfato carboxilasa (enzima ciclo de Calvin), por lo que carece de la ruta principal de fijación de CO_2 .

Estos profundos cambios morfológicos y metabólicos que se dan en la diferenciación a heterocisto están fuertemente controlados por reguladores

transcripcionales, entre ellos destaca la proteína NtcA. Su estructura cristalina ha sido resuelta para *Anabaena* sp. PCC7120 (Wisen et al., 2004). NtcA es necesaria para la formación de heterocistos y parece ser que actúa sensando el balance C-N en la célula gracias a la molécula de 2-oxoglutarato (Tanigawa et al., 2002). Según sea el nivel de 2-oxoglutarato, NtcA modula la transcripción de genes formadores de heterocistos (*hetR*) y responsables del metabolismo del nitrógeno (*nifHDK*; genes estructurales de la nitrogenasa). (Herrero et al., 2001)

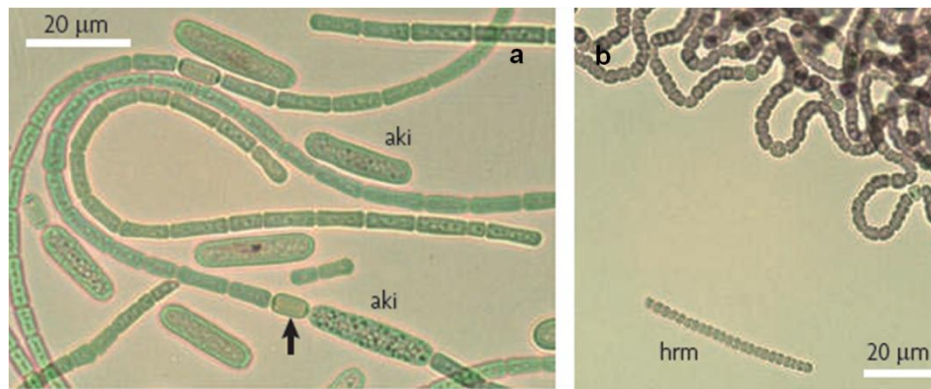


Figura 1.1.3.- Tipos celulares en cianobacterias formadoras de heterocistos. (a) Filamentos de *Anabaena cylindrica* con heterocistos (flecha negra) y akinetos (aki). (b) Filamentos de *Nostoc* sp. PCC 9203 con células vegetativas y heterocistos, y un hormogonio (hrm; notar el pequeño tamaño de estas células). (Adaptado de Flores & Herrero 2010)

1.1.4. Ficobilisomas

Los ficobilisomas son complejos proteicos que actúan en la captación de luz y transmisión de energía al fotosistema II. Las ficobiliproteínas que los forman absorben en regiones del visible donde la clorofila a no es muy eficiente. Esto hace que las cianobacterias puedan sobrevivir en zonas poco luminosas.

Los ficobilisomas de *Anabaena* sp. PCC 7120 están compuestos por un core o núcleo y una “envuelta” o rod. El core está formado por aloficocianina y el rod por ficocianina que se une al core y ficoeritrocianina. (Ducret et al.; 1996) La luz es captada por la ficoeritrocianina que tiene el pigmento de más alta energía. Esta energía se transfiere luego a los pigmentos de menor energía, ficocianina y aloficocianina. Por último se transfiere a la clorofila a del fotosistema II al que se une el ficobilisoma. (Figura 1.1.4.)

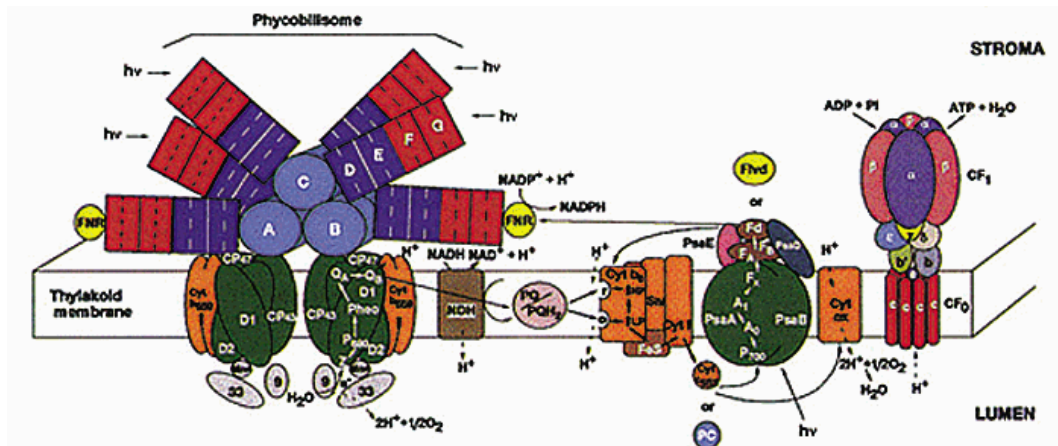


Figura 1.1.4- Estructura de un ficobilisoma y su conexión con la cadena fotosintética

Cuando la cianobacteria detecta deficiencia de nitrógeno las ficobiliproteínas se degradan (Yamanaka & Glazer 1980). Los aminoácidos resultantes son utilizados para la síntesis de proteínas necesarias en la diferenciación a heterocistos. Es tal si nivel de degradación que en los heterocistos se pierde la autofluorescencia (producida por las ficobiliproteínas).

1.2. *Anabaena* sp. PCC 7120

La clasificación taxonómica de *Anabaena* sp. PCC 7120 por orden es la siguiente: Bacteria, Cyanobacteria, Nostocales, Nostocaceae, *Anabaena*, *Anabaena* sp. PCC 7120.

Esta bacteria es un importante modelo para el estudio de diferenciación de los heterocistos. Un paso importante para este estudio fue la secuenciación de su genoma (Kaneko et al., 2001), el cual se puede encontrar en la base de datos **cyanobase** (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). En concreto, *Anabaena* PCC 7120 posee un cromosoma de 6,4 Mb y 6 plásmidos; α (0,4 Mb), β (0,2 Mb), γ (0,1 Mb), δ (55 Kb), ϵ (40 Kb), ζ (5 Kb). Un análisis bioinformático de este genoma (Ohmori et al., 2001) ha revelado que posee un gran número de proteínas con dominios multifuncionales implicadas en señalización, por ejemplo posee múltiples Ser/Thr quinasas y otras implicadas en la transducción de señal mediante cAMP.

1.3. La familia de proteínas Fur

1.3.1. Características generales de las proteínas Fur

Las proteínas de la familia Fur poseen un tamaño relativamente pequeño, entre 13 y 19 kDa. Poseen secuencias altamente conservadas entre ellas, el más

significativo es el motivo rico en Histidina $H_{3-5}X_2CX_2C$. El punto isoelectrico teórico basado en las secuencias aminoacídicas ronda valores próximos a 7 o ligeramente superiores.

La primera estructura cristalina de Fur fue obtenida de *P. aeruginosa*. (Pohl et al., 2003). Se trata de un dímero, donde cada monómero posee dos sitios de unión a metal, uno de Zn^{2+} y otro de Fe^{2+} que actúa como regulador. (**Figura 1.3.1**)

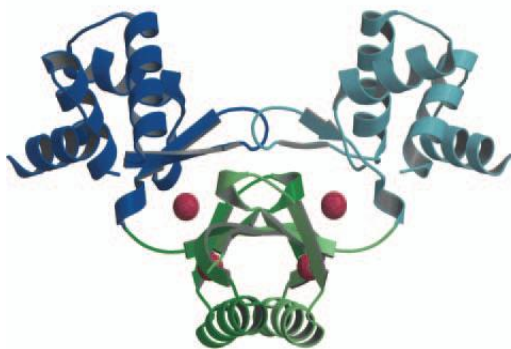


Figura 1.3.1.- Estructura cristalina del dímero de Fur de *P. Aeruginosa*. El dominio de unión a DNA se representa en la parte superior y el dominio de dimerización en la inferior. Las esferas representan al metal unido. (adaptado de Pohl et al., 2003)

Además, se observan dos dominios, uno N-terminal implicado en la unión a DNA y otro C-terminal de dimerización donde se encuentra el sitio de unión a metal regulador. Gracias a este modelo y a estudios *in vitro* se concluyó que Fur se unía al surco mayor del DNA mediante dos dímeros, uno en cada hebra del DNA.

1.3.2. Función y mecanismos de regulación de Fur

Inicialmente, las proteínas de la familia Fur (Ferric Uptake Regulator) se describieron como reguladores transcripcionales responsables de mantener la homeostasis de hierro en la célula. Cuando la disponibilidad de hierro es adecuada, Fur se une de forma específica, utilizando al Fe^{2+} como represor, a una secuencia palindrómica del DNA llamada *iron box* o caja Fur. (Escolar et al., 1998). (**Figura 1.3.2**)

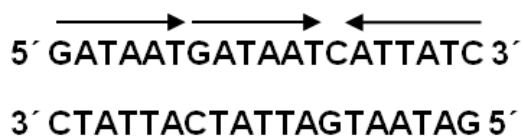


Figura 1.3.2.- Caja Fur. Compuesta por tres repeticiones de la secuencia palindrómica GATAAT, dos de estas repeticiones directas y otra indirecta.

Con esta unión se impide la transcripción de genes relacionados con la incorporación de Fe^{2+} (sideróforos o receptores de hierro). Fur también regula la expresión de proteínas implicadas en la defensa frente al estrés oxidativo o de la cadena fotosintética. Esto último se explica porque el hierro es capaz de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno y porque el aparato fotosintético utiliza al Fe^{2+} como transportador de electrones. Si por el contrario, se está frente a una

deficiencia de hierro, Fur deja de unirse al DNA y permite la transcripción de genes que capten hierro y compensen su falta.

Además, la expresión de Fur está altamente regulada por diversos mecanismos como un RNA antisentido que inactiva al mRNA de Fur (Hernández et al., 2006). Fur también se regula negativamente a nivel transcripcional a través de NtcA (López-Gomollón et al., 2007) o de sí misma entre otras proteínas.

1.4. La proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120

Basándose en la información obtenida de la secuencia del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 se identificaron tres posibles proteínas Fur; dichas proteínas se clonaron y sobreexpresaron. Se les identificó como FurA (gen *all1691*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*) (Hernández et al., 2004). **FurA** ha sido bastante estudiada por el grupo donde he realizado el Proyecto Fin de Máster y es la que presenta mayor homología con las proteínas Fur descritas. **FurB** se une inespecíficamente al DNA para protegerlo del daño oxidativo (López-Gomollón et al., 2009). Y por último, **FurC** es la menos estudiada y la que presenta menos homologías con las proteínas Fur hasta ahora descritas.

FurC tiene 149 aminoácidos y un peso molecular de 17328,3 Da. Su punto isoeléctrico teórico según su secuencia primaria es de 5,38. Su coeficiente de extinción molar teórico a 280 nm calculado con el algoritmo abajo desarrollado es de $14565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (asumiendo que todas las cisteínas están formando puentes disulfuro) o $14440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (asumiendo que las cisteínas están reducidas).

$$\epsilon = N^{\circ}(\text{Tyr}) \cdot \text{Ext}(\text{Tyr}) + N^{\circ}(\text{Trp}) \cdot \text{Ext}(\text{Trp}) + N^{\circ}(\text{Cystine}) \cdot \text{Ext}(\text{Cystine})$$

Su secuencia aminoacídica es la siguiente:

**MQQQAISTKPIRSLEDALERCQLLGMRVSRQRRFILELLWQANEHLSAREIYDRLNQ
QGKDIGHTSVYQNLEALSTQGIIESIERCDGRLYGNISDSHSHVNCLDTNQILDVHIQL
PEAFIQEVEQRTGVKITDYSINFYGYRHPQDEE**

- Posee solamente 3 **cisteínas** (subrayadas).
- Su secuencia consenso **rica en histidinas** (marcada en gris) es bastante distinta de la conservada en otras proteínas Fur ($\text{H}_{3-5}\text{X}_2\text{CX}_2\text{C}$).

Estos datos han sido obtenidos con la aplicación ProtParam del servidor Web ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2. OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo es identificar qué funciones tiene FurC en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120.

Para lograr este objetivo se han utilizado diversas estrategias: sobreexpresar FurC en *Anabaena* sp. PCC7120, estudiar este mutante, analizar la transcripción del gen *furC* por RT-PCR en deficiencia de nitrógeno en *Anabena*. Más avanzado el trabajo se decidió abordar también el estudio de las proteínas que se unían a FurC mediante un ensayo de pull-down.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Técnicas de cultivo y cepas empleadas

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo se describen en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1.- Cepas usadas en el estudio		
Cepas	Características	Referencias
<i>E.coli</i>		
DH5 α	<i>F- ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-.</i> Para el mantenimiento de plásmidos.	Invitrogen
BL21(DE3)	<i>F- ompThsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3).</i> Para la sobreexpresión y purificación de GST-FurC	EMD Biosciences
ED8654	<i>F- e14 -(mcrA-) recA 56 lac-3 o lacY1 galK2 galT22 glnV44 supF58 metB1 hsdR514 (rK-mK+)trpR55.</i> Para conjugación triparental.	Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla, España
CPB1893	<i>mcrA-mcrB- M .Eco K+ R. Eco K-.</i> Para conjugación triparental	Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla, España
<i>Anabaena sp.</i>		
PCC 7120	Wild type	Instituto Pasteur, Paris, Francia
EB2770FurC	Contiene el plásmido pAM2770FurC. Sobreexpresa <i>furC</i>	Este trabajo

El cultivo líquido de *E.coli* se realizó en medio *Luria-Bertani*, que fue suplementado con ampicilina 50 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml o cloranfenicol 30 μ g/ml cuando fue necesario. Las condiciones fueron de 200 rpm de agitación y 37°C de temperatura. Para el medio sólido se complementó el líquido con 1,5% de agar.

Anabaena sp. PCC7120 y las cepas derivadas fueron crecidas a 30°C en medio BG11 (Rippka et al., 1988) suplementado con neomicina 50 μ g/ml, estreptomicina 4 μ g/ml o espectinomicina 4 μ g/ml cuando fue necesario.

Para la cepa de sobreexpresión EB2770FurC se añadió CuSO₄ a una concentración final de 1 μ M para inducir el promotor *petE* del plásmido pAM2770 (Buikema y Haselkorn 2001). Para cultivos de 50 ml líquidos las cepas fueron crecidas en un incubador con 120 rpm de agitación y 20 μ E m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica. Para cultivos de mayor volumen se incubaron con agitación por burbujeo en frascos Roux.

Para el medio sólido se complementó con 1% de agar noble.

Para los experimentos con cultivos deficientes en nitrógeno se recogieron células con 3-5 μ g clorofila ml⁻¹ por centrifugación, se lavaron con medio BG11 sin NaNO₃ y se resuspendió en este medio para su posterior cultivo.

3.2. Manipulación de ácidos nucleicos

Los plásmidos y oligonucleótidos que se han utilizado se resumen en la **tabla 3.2.a.** y en la **tabla 3.2.b.**

Tabla 3.2.a.- Plásmidos y oligonucleótidos usados en el estudio		
Plásmidos	Características	Referencias
<i>E.coli</i>		
pGEX 4T-3	Vector de sobreexpresión, para clonar proteínas y purificarlas fusionadas a GST (glutación-S-transferasa). Amp ^r .	GE healthcare
pGEX-FurC	Vector para purificar FurC fusionada a GST. El gen <i>furC</i> fue clonado en los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Sal</i> I	Trabajo previo de la autora
pRL 443	Plásmido conjugativo. Amp ^r	Elhai et al. (1997)
pRL 623	Plásmido helper, para la conjugación triparental. Contiene la región mob necesaria para la movilización de plásmidos y metilasas de <i>Anabaena</i> . Cm ^r ; Mob ColK, M-AvaII, <i>Eco</i> 47II, MEco T221	Elhai et al. (1997)
<i>Anabaena sp.</i>		
pAM2770	Plásmido para sobreexpresión en <i>Anabaena sp.</i> 7120. Nm ^r /Km ^r	Lee et al. (2003)
pAM2770FurC	Plásmido derivado del anterior con el gen <i>furC</i> clonado en los sitios <i>Nde</i> I y <i>Bam</i> HI	Este trabajo

Tabla 3.2.b.- Plásmidos y oligonucleótidos usados en el estudio		
Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Propósito
FurC-pAM2770_up	GGAATTCCATATGCAGCAACAGGCAATATC	Clonar <i>furC</i> en pAM2770
FurC-pAM2770_dw	CGGGATCCCTACTCTTCATCTTGAGGATGC	
seq2770_up	GCCCGAAGTATGACAGATTG	Secuenciación para comprobación de clonaje en pAM2770
seq2770_dw	GCGATTAAGTTGGGTAACG	
rnpB_up	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG	RT-PCR (housekeeping)
rnpB_dw	AAAAGAGGAGAGAGTTGGTGG	
FurC_up	ATGCAGCAACAGGCAATATC	RT-PCR
FurC_dw	GAGGATGCCGATATCCATAG	
NtcA_up	CGTGACACAAGATAAGGCCC	RT-PCR
NtcA_dw	CTGTCTGCTGAGAGTCACAGG	
HetR_up	GGCTTTTAGCGCCATGAC	RT-PCR
HetR_dw	GGGGATACCACCTACTTGGTG	

3.2.1. Extracción de RNA

Consideraciones previas

Fue necesario minimizar las contaminaciones con RNasas porque son muy estables y activas y con pequeñas cantidades se destruye el RNA. Para evitar esta destrucción fue imprescindible el uso de guantes sin polvo, lavar las superficies cercanas al área de trabajo con NaOH 0,4 N. Usar agua tratada con DEPC (dietilpírocarbonato), que es un inhibidor de RNasas ya que reacciona rápidamente con los grupos amino. Otra consideración fue el uso de material estéril autoclavado e incluso comercial libre de RNasas.

Para el aislamiento de RNA de cianobacterias se sigue el siguiente protocolo (adaptado de Ausubel et al., 2000):

Toma de muestra

- Se recogieron las células por centrifugación a 4000 rpm, 5 min a 4°C.
- Se resuspendió el pellet en 600 µl de Tris 50 mM (pH 8), EDTA 100 mM y 130 µl de cloroformo.
- Se incubaron 3 min en hielo, se centrifugaron 5 min a 13000 rpm.
- Se eliminaron la fase acuosa y orgánica y el pellet se congeló con N₂ líquido y se guardó inmediatamente a -80°C. Esta congelación con N₂ líquido sirve para parar la maquinaria de transcripción, si se congela poco a poco se empiezan a transcribir genes de respuesta al frío cambiando las condiciones que nos interesan.

Extracción de ácidos nucleicos

- Se resuspendió la muestra obtenida en la etapa anterior en 300 µl de buffer de resuspensión (sacarosa 0.3 M, acetato de sodio 10 mM pH 4.5), 100 µl de Na₂-EDTA 250 mM pH 8, 400 µl de buffer de lisis (SDS 2%, acetato de sodio 10 mM pH 4.5) y 1 ml de fenol ácido a 65°C.
- Se homogeneizó con un vortex y se incubó a 65°C 2.5 min. Se repitió este paso. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm.
- Se recogió la fase acuosa y se extraía con 1 ml de Trizol y 0.2 ml de cloroformo. Se volvió a extraer con un volumen de cloroformo.
- Se añadió a la fase acuosa 2 volúmenes de isopropanol y se sumergió en N₂ líquido. Se centrifugó 30 min a 14000rpm y 4°C.
- Se descartó el sobrenadante y lavó el pellet casi transparente en EtOH al 70%.

- Tratamiento con DNasaI:

- Se resuspendió el pellet en 180 µl de H₂O–DEPC, 20 µl de buffer de DNasa y 2 µl de DNasaI. Se incubó 1 hora a 35°C.
- Se ajustó el volumen a 400 µl con H₂O–DEPC, se extrajo con fenol: cloroformo (1:1) y luego con cloroformo.
- Se añadió a la fase acuosa 1/5 V de LiCl 10 M y 2 V de EtOH absoluto. Se sumergió el eppendorf en N₂ líquido y se centrifugó 30 min a 14000 rpm y 4°C.
- Se lavó el pellet con EtOH al 70%.
- Se resuspendió el pellet en 20 µl de H₂O–DEPC para un volumen inicial de 30 ml de cultivo.
- Sobre este RNA se realizó una PCR para comprobar que no hubiera restos de DNA genómico. Finalmente, se comprobó la integridad de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.2.2. Extracción de DNA genómico de *Anabaena* sp. para PCR de colonia

Se cogió con un asa de platino un poco de cultivo de una placa y se resuspendió en 200 µl de Tris 1mM pH 8, EDTA 1mM, tritón 1%. Se incubó 4 min a 95°C. Se realizaron tres extracciones con cloroformo (1:1) y se realizó una PCR cogiendo 20 µl de este DNA como molde en un volumen final de reacción de 50 µl.

3.2.3. Retrotranscripción semicuantitativa (RT-PCR)

Esta técnica permite, de un modo semicuantitativo, detectar la concentración relativa de transcritos en diferentes muestras de RNA. Para ello, lo primero que se hace es obtener cDNA a partir de una muestra de RNA (retrotranscripción):

- Se incubaba aproximadamente 1 µg de RNA con 150 ng de primer inespecíficos (Invitrogen, permiten la obtención de cDNA de cualquier mRNA de la muestra) y 1 µl de tampón de hibridación 10x (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM, KCl 150mM (1x)). Esto se llevaba a un volumen final de 10 µl con H₂O–DEPC y se incubaba 10 min a 85°C (desnaturalización) y luego 1 h a 50°C (hibridación de cebadores) en un termociclador.
- Se añadía a la mezcla anterior 2 µl de dNTP 2.5 mM, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de Retrotranscriptasa 200 U (Invitrogen), 4 µl de tampón comercial 5x y 1 µl de H₂O–DEPC.
- Se incubaba 1h a 47°C (extensión cebadores), 15 min a 75°C (detención reacción) y 24h a 4°C.

Sobre este cDNA se realizaba una PCR usando los oligos *mnpB*, que es un gen “Housekeeping”, cuyo nivel de transcripción no varía cuando cambian las condiciones celulares. El número de ciclos usados fue 23 (ciclo de fase exponencial de PCR para este gen). La cantidad de cDNA fue variando hasta obtener la misma intensidad de banda en un gel de agarosa del 1% para todas las muestras. Tras esto, se realizó una PCR con los oligos del gen a analizar con 30 ciclos (ciclo exponencial) y con la misma cantidad o proporcional de cDNA usada para igualar el housekeeping.

3.3. Métodos genéticos

3.3.1. Transformación mediante choque térmico en *E.coli*

Se llevó a cabo una transformación en la cepa *E.coli* DH5 α para obtener plásmidos en gran cantidad para realizar la clonación y conservar el constructo creado. En la cepa BL21 (DE3) se transformó para realizar la sobreexpresión de la proteína GST-FurC o GST.

El proceso consiste en adicionar 1-10 μ l de DNA a 200 μ l de células competentes descongeladas en baño de hielo, mezclar suavemente e incubar 30 minutos en hielo. Tras esto, se realiza un choque térmico de 90 segundos a 42°C y 1 minuto en hielo. Se adicionan 800 μ l de LB estéril sin antibiótico y se incuba durante 45 minutos.

Se transfieren 200 μ l del cultivo a una placa de LB con antibiótico, el resto de cultivo se centrifuga, se desecha el sobrenadante dejando unos μ l; se resuspende y se siembra en otra placa de LB con antibiótico. Estas placas se incuban O/N a 37°C.

3.3.2. Conjugación triparental en *Anabaena* PCC 7120

La transferencia de DNA a *Anabaena sp.* es un proceso difícil debido a su gruesa pared celular y a que es una bacteria filamentososa. Se han descrito varios métodos, pero el más eficaz es la conjugación triparental usada en este trabajo y descrita por Peter Wolk (Elhai y Wolk, 1988b), mejorado en 1997 por el descubrimiento de enzimas de restricción de *Anabaena sp.* Estas enzimas disminuían la eficiencia de la conjugación (Elhai et al., 1997) por lo que se decidió usar cepas de *E.coli* con metilasas para estos sitios y así aumentar la eficiencia. El proceso es el siguiente:

- Se cultivaban toda la noche las estirpes de *E.coli* que se iban a usar:
 - *E.coli* ED8654; contiene el plásmido pRL443 con los genes necesarios para la formación del *pili* conjugativo.
 - *E.coli* cpb1893; que contiene el plásmido pAM2770FurC (el plásmido de carga queremos introducir en *Anabaena*) y el pRL623 que contiene las metilasas de los

sitios de restricción *Aval*, *II* y *III* de *Anabaena* y que metilan el plásmido a transferir para que no sea degradado. El plásmido pRL623 también contiene el gen *mob* que codifica para la proteína responsable de cortar la secuencia *bom* u *oriT*; secuencia de movilización.

- Se refrescaban los cultivos anteriores en fase estacionaria al 2.5 % en LB con el respectivo antibiótico y se incubaban 2.5 horas.
- Se recogían las células por centrifugación y se lavaban dos veces con LB estéril y se resuspendían en unos 60 µl de LB. Se tenía especial cuidado con la cepa ED8654 para no romper el *pili*. Se mezclaban las dos cepas de *E.coli* durante 2 horas a T^a ambiente sin agitación. En este paso la cepa ED8654, le transfiere el plásmido que codifica para el *pili* a la *cpb1893*.
- Se concentraba un cultivo de *Anabaena* PCC 7120 en fase de crecimiento exponencial y se medía la cantidad de clorofila. Se añadió el equivalente de células *Anabaena sp.* a 3 µg de clorofila a la mezcla de *E.coli* anterior.
- Se ponía un filtro de nitrocelulosa (Millipore) estéril sobre una placa de medio BG11+5% LB sólido. Se extendía la mezcla de conjugación del paso anterior sobre el filtro. Las placas se incubaron 2 horas a 30°C en oscuridad y 24 horas a 20 µE de intensidad lumínica.
- A continuación, los filtros se trasladaban a una placa nueva de BG11 sin LB, y a las 24 horas a una placa de BG11 con el antibiótico necesario.
- Estos filtros se trasladaban a placas frescas de BG11 con antibiótico cada 48 horas para eliminar las colonias que no hubieron adquirido el plásmido de interés.
- A las tres semanas comenzaron a aparecer las colonias resistentes que se cultivaron en medio sólido sin el filtro. Sobre estas colonias se realizó una PCR con los oligos seq2770 para verificar que tenía el plásmido pAM2770 con el inserto *furC*.
- Las colonias positivas se cultivaron en medio líquido BG11 suplementado con neomicina y con 1 mM de CuSO₄. Para comprobar la sobreexpresión de *furC* se realizó una RT-PCR. Sería más adecuado realizar un Western pero no se poseían anticuerpos anti-FurC.

3.4. Manipulación de proteínas

3.4.1. Purificación de FurC-GST y GST

Para la purificación de la proteína de fusión GST-FurC y GST se utilizó la cromatografía por afinidad a glutation. La matriz usada fue *Glutathione Sepharose 4 Fast FLOW* de Amersham Biosciences.

El primer paso fue homogeneizar la biomasa que sobreexpresaba la proteína de interés con 5 volúmenes (v/w) de **Buffer de lisis** (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, DTT 2 mM, PMSF 3 mM) en baño de hielo. Luego se lisaron las células mediante 10 ciclos de sonicación en baño de hielo. Cada ciclo consta de 45 seg de sonicación (80% de amplitud y 0,5 de ciclo) y 30 seg de descanso. Se centrifugó el lisado 3 veces a 4°C y 18000 rpm durante 20 minutos recogiendo el sobrenadante y desechando el pellet. Tras esto, se pasó por un filtro de 0,8 µm y luego por otro de 0,45 µm para eliminar restos que obstruyan la columna.

Seguidamente, se aplicó el lisado a la columna previamente empaquetada y equilibrada con 5 volúmenes de **Buffer de unión** (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). Se continuó pasando Buffer de unión hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0,08.

Se eluyó con 4 volúmenes del **Buffer de elución** (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1mM, Glutación 20 mM); se recogieron alícuotas del eluido de aproximadamente 1 ml. Posteriormente, se analizó la presencia de proteína en las alícuotas mediante una electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida. La matriz se lavó y se regeneró siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2. Extracción de proteínas totales de *Anabaena sp.* 7120

Para la extracción de proteínas totales de *Anabaena sp.* se partía de 50 ml de un cultivo líquido. Se colectó el pellet por centrifugación durante 5 min a 4000 rpm. Dicho pellet se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, PMSF 1mM. Esta suspensión se sometió a 5 ciclos de 45 segundos de sonication (0.8 amplitud y 0.5 ciclo) y 30 de descanso, en hielo. Se centrifugó el sonication durante 1 min a 14000 rpm y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas totales.

3.4.3. Dot-blot

Un dot-blot es similar a un Western-blot pero lo que se hace es añadir las proteínas directamente en una membrana de PVDF, en vez de transferirlas desde un gel de poliacrilamida. En concreto en este trabajo:

- Se incubó la membrana de PVDF en metanol 10 segundos y luego 2 min en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 0.2 M, SDS 0.1% y metanol 20%). Esto se hace para que la membrana se vuelva más afín por el agua, ya que es muy hidrofóbica.
- Se pusieron las gotas (~1 µg de proteína) sobre la membrana de PVDF.

- La membrana se incubó con TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.1%) + 4% de leche desnatada en polvo 1h a T^a ambiente o toda la noche a 4°C con agitación.
- Se incubó 1 h a T^a ambiente con el anticuerpo (Anti-FurA o Anti-FurB (Hernández et al., 2002)) 1:1000 en TBST.
- Se lavó tres veces con TBST durante 5 min. Se incubó 1h a T^a ambiente con el anticuerpo secundario Anti-IgG conjugado con peroxidasa (Sigma A6154) 1:10000 en TBST. Tras esta incubación, se lava la membrana tres veces con tampón fosfocitrato (ácido cítrico 24.3 mM pH 5.3, Na₂HPO₄ 51.4 mM).
- Se reveló la membrana añadiendo 20 mg de DONS (dioctilsulfosuccinato) disuelto en 5 ml de EtOH y 80 mg de TMB (tetrametilbencidina) disuelto de 5 ml de EtOH.
- Se añadió 15 µl de H₂O₂ al 30 % y se dejó desarrollar el color. La reacción se paró sumergiendo la membrana en agua destilada.

3.4.4. Ensayo de Pull-down

Para identificar proteínas de unión a FurC se realizó un ensayo de Pull-down, (Horiuchi et al., 2010), (Marteyn et al., 2009) que consistía en mezclar la proteína FurC fusionada a GST con un extracto crudo de *Anabaena sp.*, para que FurC se una a las proteínas más afines. Después se purificó esta mezcla con una matriz de unión a GST. Se cargó la mezcla resultante en un gel de SDS-PAGE para recortar las bandas diferenciales en comparación a un control con GST y otro control con extracto crudo sólo. En concreto se realizó de la siguiente forma:

- Se colectaron las células de 50 ml de cultivo por muestra de *Anabaena sp.* en fase exponencial (3-5 µg clorofila/ml) por centrifugación durante 10 min a 4000 rpm.
- Se lavó este pellet dos veces con PBS, DTT 10 mM, PMSF 1 mM, y se resuspendió en 500 µl por muestra de dicho buffer.
- Se sonicó durante cinco ciclos de 45 segundos (80% de amplitud y 0,5 de ciclo) con descansos de 30 segundos. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 10 min a 14000 rpm y 4°C.
- De este sonicado se pasaron 500 µl a un eppendorf como control, 500 µl a otro al que se le añadió 400 µg de GST-FurC y 500 µl a otro al que se le añadió 400 µg de GST.
- Se incubó 2 h a 4°C y con agitación suave. Se añadieron 40 µl de matriz Glutathione-Sepharose pre-equilibrada con el buffer anteriormente citado.
- Se incubaron otras 2 h a 4°C y agitación suave.

- Se lavó la matriz con 200 µl de buffer hasta que se observó la matriz de color blanco.
- Se eluyó con 30 µl del buffer y 10 µl de buffer de carga desnaturizante.
- Se hirvió 5 min, se centrifugó a máxima velocidad 5 min y se cargaron 15 µl de la muestra en un gel de SDS-PAGE de 7.5% o del 15%.
- Tras teñir con Coomassie y desteñir, se buscaron las bandas diferenciales y se mandaron al Servicio Científico Técnico de proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Secuenciación peptídica por espectrometría de masas

En el citado servicio, las bandas fueron analizadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS y MS/MS). Con esta técnica lo que se hace es digerir las muestras con tripsina, con ello obtenemos una mezcla de péptidos que son analizados con el espectrómetro de masas 4800plus MALDI-TOF/TOF MSMS y Tempo LC-MALDI (Applied Biosystems). Este espectrómetro ioniza los péptidos, estos se separan en función de su relación carga/masa gracias a un campo magnético. Esta relación carga/masa es detectada por el aparato, que no proporciona como resultado la masa de todos los péptidos resultantes de la digestión con tripsina. Con estas masas se puede averiguar la secuencia aminoacídica de los péptidos que se comparan con los registrados en la base de datos Mascot (www.matrixscience.com). Por comparación y homología, esta base de datos nos da el nombre de la proteína, que con más probabilidad está en nuestra banda.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Determinación de clorofila

Para hacerse una idea del estado de un cultivo de cianobacterias se suele medir la concentración de clorofila. Se utilizó el método descrito por Mackinney en 1941. Para ello se tomaron 200 µl de cultivo, se le añadió 1 ml de metanol, se agitó durante 2 min, y se centrifugó 2 min a 14000 rpm. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 665 nm. El valor obtenido se dividió por el coeficiente de extinción ($\epsilon = 74.46 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$) y se multiplicó por el factor de dilución ($6 \rightarrow 1200/200$). El proceso se debe realizar en oscuridad.

3.5.2. Determinación de carotenoides

Otro parámetro para caracterizar un cultivo de cianobacterias es la cuantificación de carotenoides (Davies 1976). Estos pigmentos están formando parte de la cadena de transporte fotosintético como fotoprotectores. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 5000 x g durante 5 min, se lavó el pellet con agua destilada y se resuspendió en 2 ml de agua destilada. Esta suspensión se sonicó durante cuatro periodos de 45 segundos (a 80% de amplitud y 0,5 de ciclo) y 30 segundos de descanso en hielo. Después se centrifugó a 2500 x g durante 5 min, se cogió el sobrenadante y por cada ml de sonicado se añadieron 4 ml de acetona. Se midió la absorbancia a 480, 465 y 663 nm frente a acetona al 80%. La absorbancia neta de los carotenoides viene dada por la siguiente fórmula, tomando $\epsilon_{480} = 250 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

$$A_{480} (\text{carotenoides}) = A_{480} + 0.144 \cdot A_{663} - 0.638 \cdot A_{465}$$

3.5.3. Determinación de ficobiliproteínas

Para la determinación de ficobiliproteínas se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior pero sin adicionar acetona al sonicado (Glazer 1976). Se mide la absorbancia a 620 nm del sonicado después de centrifugar frente a agua. El coeficiente de extinción es $7.41 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

3.5.4. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó con un kit comercial basado en el método del ácido bicinchonínico (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Este método es similar al de Lowry, se preparó una recta de calibrado con albumina sérica bovina entre 2 y 0.025 mg/ml. Se tomaron 50 μl de cada muestra o punto de la recta y se le añadió 1 ml del reactivo A+B (50 partes de A y 1 parte de B). Se incubó durante 30 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 562 nm. Esta absorbancia se interpolaba en la recta de calibrado para calcular la concentración de proteínas totales.

3.6. Microscopía

El examen microscópico de *Anabaena sp.*, tanto óptico como de fluorescencia, fue realizado con un microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-Fluorescence. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon DXM1200F acoplada a este microscopio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de la transcripción de *furC* en deficiencia de nitrógeno

Se tomaron muestras de *Anabaena* sp. 7120 a distintos tiempos después haber retirado el nitrato del medio de cultivo. En concreto a tiempo 0, 2 h, 6 h y 26 h; como control se tomaron muestras a los mismos tiempos de un cultivo al que no se le había retirado el nitrato.

Sobre estas muestras se realizó extracción de RNA siguiendo el procedimiento del apartado 3.2.a, se comprobó la integridad del RNA (**Figura 4.1.a**) y la ausencia de DNA tras tratar la muestra con DNaseI. Se realizó una retrotranscripción utilizando entre 2 y 1 µl de RNA según se observara más RNA, así se obtendrá una cantidad más equilibrada de cDNA en las diferentes muestras. En concreto, se usó la cantidad que se indica en la figura 4.1.a.

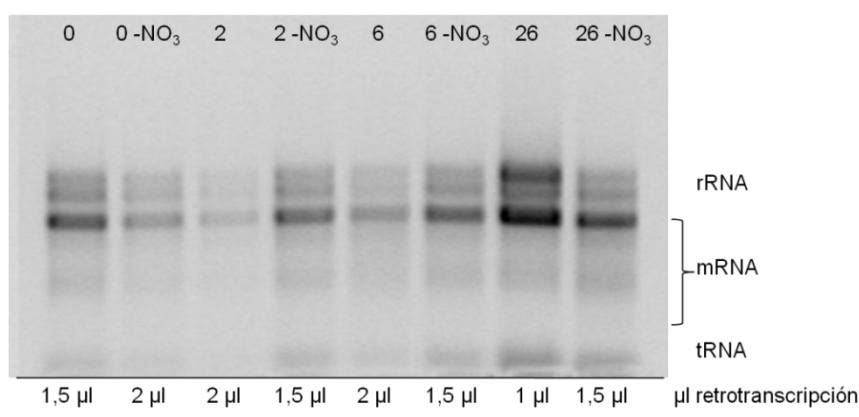


Figura 4.1.a.- Integridad del RNA aislado de *Anabaena* a diferentes tiempos con y sin nitrato en el medio de cultivo. En cada pocillo se cargó 1 µl de RNA. Como se indica las bandas más altas corresponden al rRNA la estela inferior al mRNA y las bandas más bajas al tRNA. También se indica en la parte inferior los µl de RNA que se usaron como molde para la retrotranscripción. Las muestras cargadas fueron de izquierda a derecha: t=0 h, 2 h, 6 h y 26 h, donde se indica -NO₃ se eliminó el nitrato del medio de cultivo.

Sobre el cDNA obtenido se realizó una PCR con los oligos rnpB_{up/dw}. Inicialmente, se usaron 0,5 µl de cDNA y se fue variando esta cantidad hasta igualar la intensidad de todas las bandas. (**Figura 4.1.b**) Luego, con esta misma cantidad, se realizó otra PCR con los oligos FurC_{up/dw}. Como apenas se observaba amplificación se decidió utilizar el doble de cantidad de cDNA.

El resultado fue que *furC* se transcribe más a las 6 horas tras retirar el nitrato del medio de cultivo. Esto indica que *furC* cumple algún papel en el complejo proceso de diferenciación a heterocisto, en concreto en los eventos intermedios (6-12 h) en los

cuales comienzan a aparecer pro-heterocistos. Uno de estos eventos intermedios, es la formación de la envuelta del heterocisto para crear el ambiente anaerobio necesario para la fijación de nitrógeno (Adams 2000). Otro, es la degradación de los ficobilisomas del heterocisto para ser utilizados como fuente de aminoácidos en la síntesis de otras proteínas, necesarias en el proceso de diferenciación (Grossman et al., 1993).

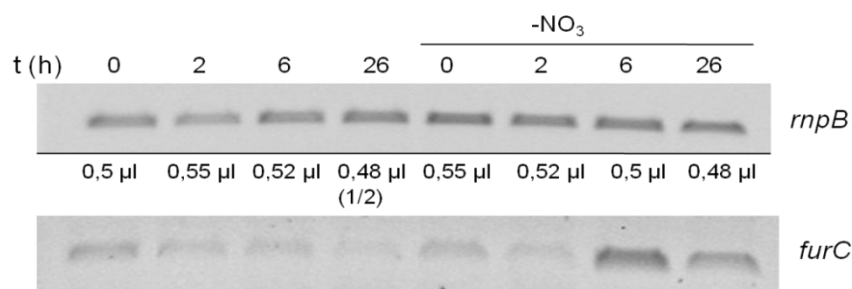


Figura 4.1.b.- Retrotranscripción semicuantitativa de *furC* cuando a *Anabaena* se le retira el nitrato del medio de cultivo. En la imagen superior se ve el housekeeping (*rnpB*) igualado para las distintas muestras. Debajo de esta imagen se muestran los μl de cDNA utilizados para conseguir la misma intensidad de amplificación para el gen *rnpB*. El doble de esta cantidad se utilizó para amplificar el mensajero de *furC*.

4.2. Ensayo de pull-down

Una forma de averiguar la posible función de una proteína es saber con qué otras proteínas interacciona. Para comprobar si FurC interaccionaba con alguna proteína de *Anabaena* sp. 7120 se llevó a cabo el ensayo de pull-down siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.4. Las proteínas GST y GST-FurC utilizadas fueron purificadas como se indica en el apartado 3.4.a. En el caso de GST-FurC, en la purificación se obtuvieron dos bandas (**Figura 4.2.a**) de las cuales la de menos peso molecular se corresponde con una FurC procesada o proteolizada.

El ensayo se llevó a cabo con tres muestras: extracto de *Anabaena* con GST-FurC, con GST y sin proteína como control. De estas muestras, se cargaron 15 μl en un gel de SDS-PAGE al 15%. Tras tinción con Coomassie se buscaron las bandas diferenciales, las que aparecían en la muestra con GST-FurC (carril 2) y no en los demás carriles. También, se buscó que estas bandas no aparecieran como impurificaciones de la proteína GST-FurC. Con todo esto, se decidió recortar las bandas 1 (~8 kDa) y 2 (~34 kDa) señaladas en la **figura 4.2.a**.

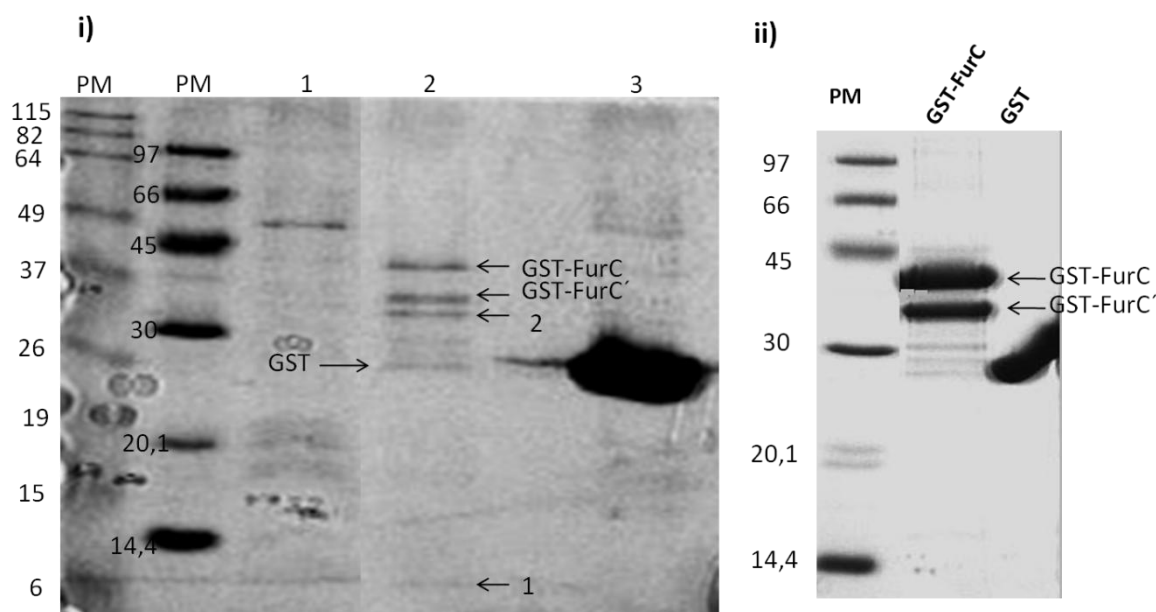


Figura 4.2.a- Gel SDS-PAGE con resultado de pull-down con extracto de *Anabaena sp.* y GST. (i) Gel SDS-PAGE al 15%, en los carriles donde se indica PM se cargaron dos marcadores de peso molecular distintos. En el carril 1 el control con extracto de *Anabaena*. En el 2, extracto de *Anabaena* y GST-FurC. En el 3, extracto de *Anabaena* y GST. Las bandas 1 y 2 son las que se unen de forma diferencial a FurC. (ii) Gel de SDS-PAGE al 15% donde se cargaron la proteínas purificadas GST-FurC y GST (~200 µg) que se utilizaron para el ensayo. De las dos bandas que se observan en el carril de GST-FurC, la inferior (GST-FurC') se correspondería con FurC procesada o proteolizada.

Las bandas 1 y 2 se recortaron intentando llevarse la menor cantidad de poliacrilamida y se enviaron al Servicio Científico Técnico de proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. En dicho servicio fueron analizadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS y MS/MS) con un 4800 plus MALDI-TOF/TOF MSMS y Tempo LC-MALDI (Applied Biosystems).

Este análisis dio como resultado que: la banda 1 se correspondía con la proteína Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated con un score de 287 (a partir de 70 es significativo); y la banda 2 con la proteína Phycobilisome 34.5 kDa linker polypeptide, phycoerythrocyanin-associated con un score de 646. Ambas de *Anabaena sp.* 7120. A continuación, se muestran los péptidos obtenidos (subrayados) con el análisis espectrométrico superpuestos con las proteínas que más score han dado de la base de datos.

- **Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated**
1 MSRLFKITAL VPSLSRTRTRQ RELQNTYFTK LVPYENWFRE QQRIQKAGGK
51 IIKVELATGK QGTNAGLQ

- **Phycobilisome 34.5 kDa linker polypeptide, phycoerythrocyanin-associated**
1 M S S S V A E R L A I R D A I G N K V E L R Q N W S E D D L Q K V F R A A Y E Q I F G R Q G I Y A S
51 Q K F T S A E A L L R N G K I S V R Q F V E I L A K S E F Y K E C F F Y K N S Q V R L I E L N Y K H
101 L L G R A P Y D Q S E I A D H V D I Y A A R G Y D A D I D A Y I Y S S E Y E N A F G N S I V P Y Y R
151 G F Q S I P G M K T V G F N R I C E L Y R G R G N S D N A Q M G R T N S R L R T K V S L N L P N G I
201 L P P T S A G T N F V S A A P T L I S S A T K G D N R M F V I E A I A G G L N T N V A V R R S R Q V
251 Y T V S Y E R L S A T Y Q E I H K R G G K I V K I S Q V

Ambas son proteínas pertenecientes a los ficobilisomas (Bryant et al., 1991), (Ducret et al., 1996). En concreto son linker, es decir, proteínas que mantienen la estructura y estado de agregación de los ficobilisomas. La de menor peso molecular se asocia a alofococianina que forma parte del núcleo del ficobilisoma (**Figura 4.2.b.**) y la de mayor peso molecular se asocia a ficoeritrocianina que pertenece a la parte externa de los ficobilisomas (Grossman et al., 1993).

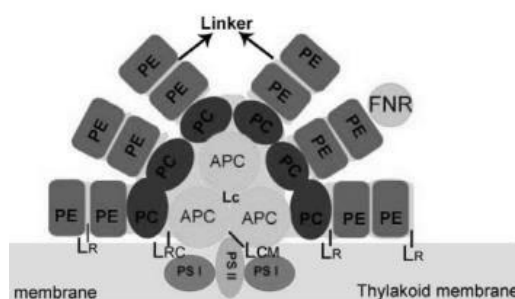


Figura 4.2.b.- Estructura de un ficobilisoma. El Core o núcleo está formado por alofococianinas (APC), que por un lado se asocian al fotosistema II y por otro a la cubierta o Rod. La cubierta está formada por ficoeritrocianinas (PE) y ficocianinas (PC). Estas ficobiliproteínas están unidas entre sí por proteínas linker. Además, los ficobilisomas están asociados a la membrana externa del tilacoide. (Adaptación de Guan et al., 2007)

Si enlazamos este resultado de que FurC une ficobiliproteínas, con el resultado del apartado anterior de que *furC* se transcribe más en deficiencia de nitrógeno y que las ficobiliproteínas se degradan en déficit de nitrógeno, podemos formular la hipótesis de que FurC está relacionada con la estabilidad de los ficobilisomas.

4.3. Obtención del mutante de sobreexpresión de FurC en *Anabaena sp.* PCC 7120.

4.3.1. Conjugación triparental

Para la obtención del mutante de sobreexpresión de FurC en *Anabaena sp.* 7120, primero se construyó el plásmido pAM2770FurC. Para ello, se amplificó el gen *furC* usando como molde DNA genómico de *Anabaena sp.* 7120. Los oligos utilizados fueron FurC-pAM2770_up/dw. El producto de amplificación se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I y se ligó con el plásmido pAM2770 previamente digerido con las

mismas enzimas. El producto de la ligación se transformó en *E.coli* DH5 α , a las colonias que crecieron en presencia de Km se les hizo una PCR con los oligos FurC-pAM2770_up/dw. De las colonias que amplificaron se seleccionó una, se aisló su plásmido y se comprobó que el inserto era el correcto por secuenciación. La secuenciación se realizó con los oligos seq2770_up/dw que hibridan flanqueando el sitio de clonaje múltiple del plásmido pAM2770. Esta secuenciación fue realizada por el Servicio de Análisis de Ácidos Nucleídos de la Universidad de Zaragoza.

El resultado fue positivo, el plásmido construido poseía el gen *furC* de *Anabaena* PCC 7120 insertado en el sitio correcto. Con dicho plásmido, se llevó a cabo una conjugación triparental siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. El primer intento fue fallido ya que no creció ninguna colonia. En el segundo intento, se decidió lavar con abundante agua el filtro de nitrocelulosa para eliminar cualquier sustancia tóxica para *Anabaena*. En esta ocasión sí se obtuvieron abundantes colonias, se eligieron varias y se sembraron en placas de BG11 Nm 50; a las que crecieron, tras varias resiembras, se les realizó una PCR en colonia. En esta PCR se utilizaron los mismos oligos que en la secuenciación. El resultado fue que las tres colonias finales analizadas amplificaron. Por tanto, se tenían tres colonias de *Anabaena* sp. 7120 con el plásmido pAM2770FurC. (**Figura 4.3.a**)

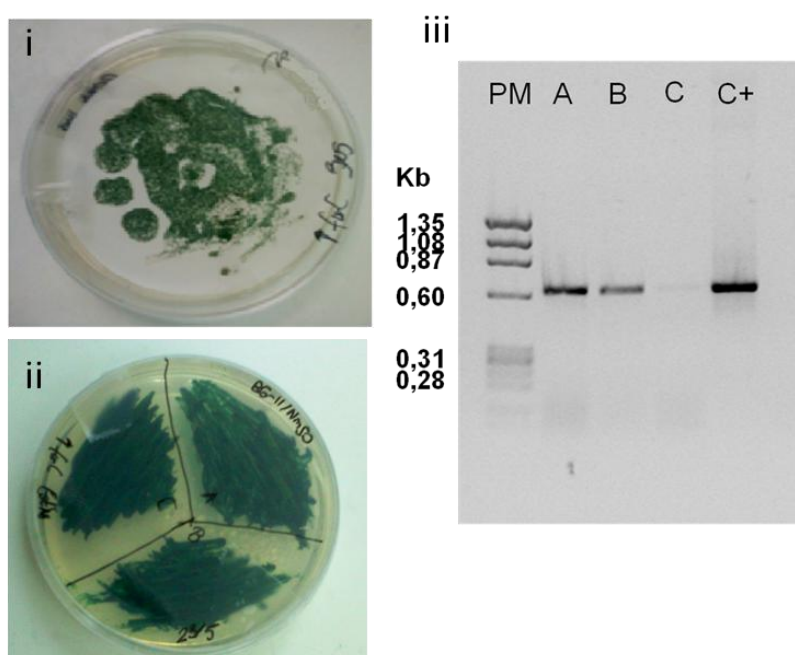


Figura 4.3.a.- Resultado de la conjugación triparental en *Anabaena* sp. 7120 con el plásmido pAM2770FurC. (i) Placa con el resultado de la conjugación. **(ii)** Placa con las colonias A, B y C crecidas de la conjugación. **(iii)** Gel de agarosa al 1% donde se cargó el resultado de la PCR de colonias (A, B o C) crecidas de la imagen ii. El último carril se corresponde con el control positivo sobre el plásmido pAM2770FurC. Como se observa, con las tres colonias se produjeron el producto de amplificación esperado, aunque con la colonia C la amplificación fue más tenue.

4.3.2. Comprobación de la sobreexpresión de FurC

En este punto se debe comprobar que verdaderamente la colonia mutante sobreexpresa la proteína FurC. Esto se suele hacer por Western blot, pero no se poseían anticuerpos anti-FurC. Sin embargo, sí se poseían contra FurA y FurC, así que se realizó un Dot-blot para comprobar si estos anticuerpos reconocían también a FurC. (**Figura 4.3.2.a.**) Para ello, se pusieron 1 o 2 μ l de las respectivas proteínas FurA, FurB y GST-FurC (no se disponía de la proteína FurC sin cola de GST); purificadas con anterioridad por el grupo donde se realizaba el trabajo. Cada proteína estaba a una concentración aproximada de 1 mM.

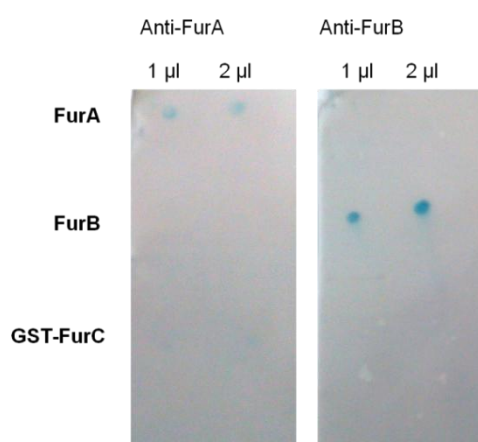


Figura 4.3.2.a.- Resultado del dot-blot para comprobar cross-reactividad de Anti-FurA y Anti-FurB. En la figura se muestran reveladas las membranas de PVDF. Donde se indica, se pusieron 1 o 2 μ l de las proteínas FurA, FurB o GSTFurC y se incubó con cada uno de los anticuerpos. Se observa que Anti-FurA sólo reconoce a FurA, y Anti-FurB sólo a FurB.

El resultado fue que los anticuerpos ensayados no reconocían a FurC, así que se decidió comprobar la sobreexpresión de FurC en el mutante de forma indirecta; viendo la sobreexpresión de su mRNA. Esto se hizo siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.2 de esta memoria. Para ello se extrajo RNA de cada colonia (A, B y C) y de una muestra control de *Anabaena sp.* 7120 wild-type; se realizó una retrotranscripción, se igualó el housekeeping (*rnpB*) y se comprobó si la expresión del mensajero de *furC* variaba. Se consiguió igualar el gen *rnpB* rápidamente con 0,5 μ l de cDNA para la colonia C; por lo que se hizo la prueba con el gen *furC* utilizando el doble de cantidad de cDNA, ya que sino no se observa el mensajero de *furC* como se vio en el apartado 4.1. (**Figura 4.3.2.b.**)

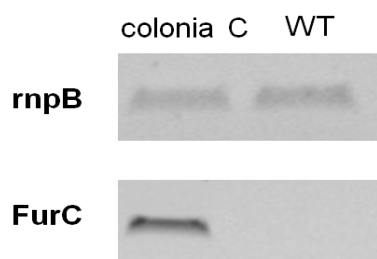


Figura 4.3.2.b- Comprobación de la transcripción de *furC* en *Anabaena* WT y en la colonia C resultante de la conjugación. En la figura se muestra el resultado de la PCR sobre cDNA con los oligos para amplificar *furC* y *rnpB*.

El resultado fue que se sobretranscribía *furC* en la colonia C (EB2770FurC) resultante de la conjugación. Para poder afirmar que se sobreexpresa la proteína FurC, será necesario obtener un anticuerpo anti-FurC; ya que aunque se sobreexpresa el mensajero, este puede tener un RNA antisentido que regule la transcripción de la proteína. Esto ya se ha visto para FurA (Hernández et al., 2006).

4.4. Caracterización del mutante EB2770FurC

Tras la obtención del mutante se debe caracterizar su crecimiento. Además, como se habían obtenido resultados que indican que FurC puede tener alguna relación con los ficobilisomas, se puso especial atención en examinar que les ocurría a las ficobiliproteínas en el mutante EB2770C.

4.4.1. Curva de crecimiento

Para caracterizar al mutante EB2770 se tomaron medidas de la densidad óptica, la concentración de clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas y proteínas totales a lo largo del tiempo. Al mismo tiempo, se hicieron estas medidas de un cultivo de *Anabaena* sp. 7120 wild-type para saber si EB2770C se comporta de manera distinta. Estas medidas se hicieron por duplicado para los dos tipos de cultivo y los resultados se muestran a continuación:

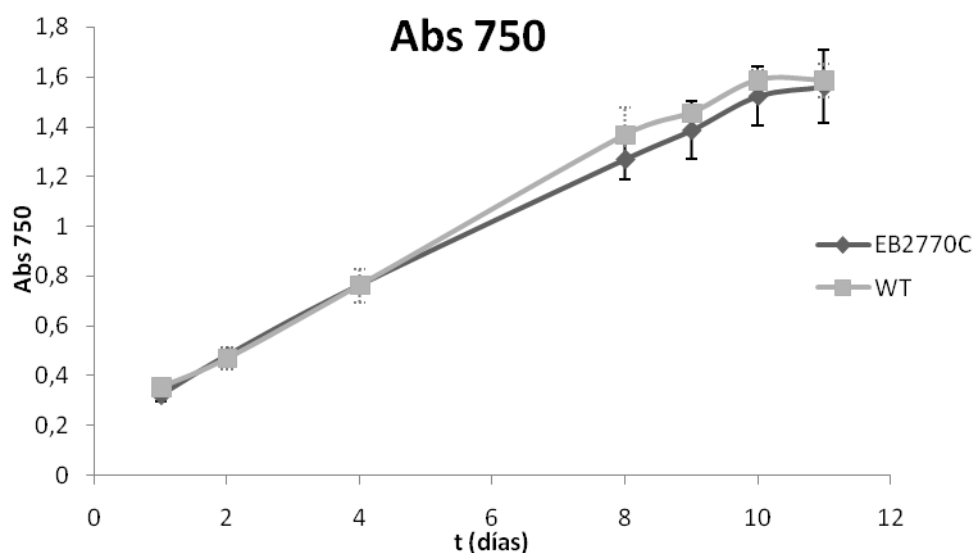


Figura 4.4.1.a.- Crecimiento del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120 expresado como densidad óptica. Las líneas verticales se refieren a la desviación estándar de dos experimentos independientes en la estirpe EB2770C (negro) y WT (gris).

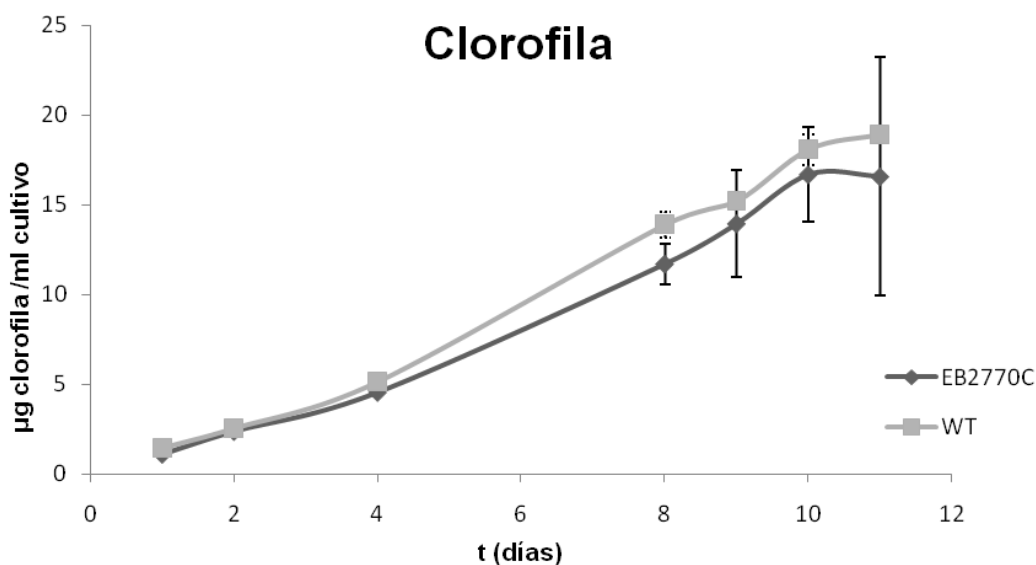


Figura 4.4.1.b.- Crecimiento del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120 expresado como contenido en clorofila (µg clorofila/ml cultivo). Las líneas verticales se refieren a la desviación estándar de dos experimentos independientes en la estirpe EB2770C (negro) y WT (gris).

En las gráficas anteriores se muestra que, al parecer, la estirpe EB2770C crece en estadios iniciales de forma similar a la estirpe wild-type. Sin embargo, cuando se alcanza la fase exponencial la estirpe EB2770C crece menos. Este resultado no es muy concluyente, ya que tenemos una variación estándar muy grande para la estirpe EB2770C en la fase de crecimiento exponencial. Esto pudo deberse a la disminución del volumen total de cultivo conforme avanzaba el experimento. Debido al burbujeo, el medio de cultivo se evaporó de forma diferente en los cultivos. Esta evaporación da lugar a aumentos de clorofila o DO por disminución del volumen (concentración de cultivo), y no por el crecimiento de *Anabaena*. Este experimento se debería de repetir controlando mejor las condiciones, pero parece dar indicios de que no hay diferencias en el crecimiento de EB2770C con respecto a la estirpe wild-type.

En cuanto a las ficobiliproteínas tenemos los siguientes resultados:

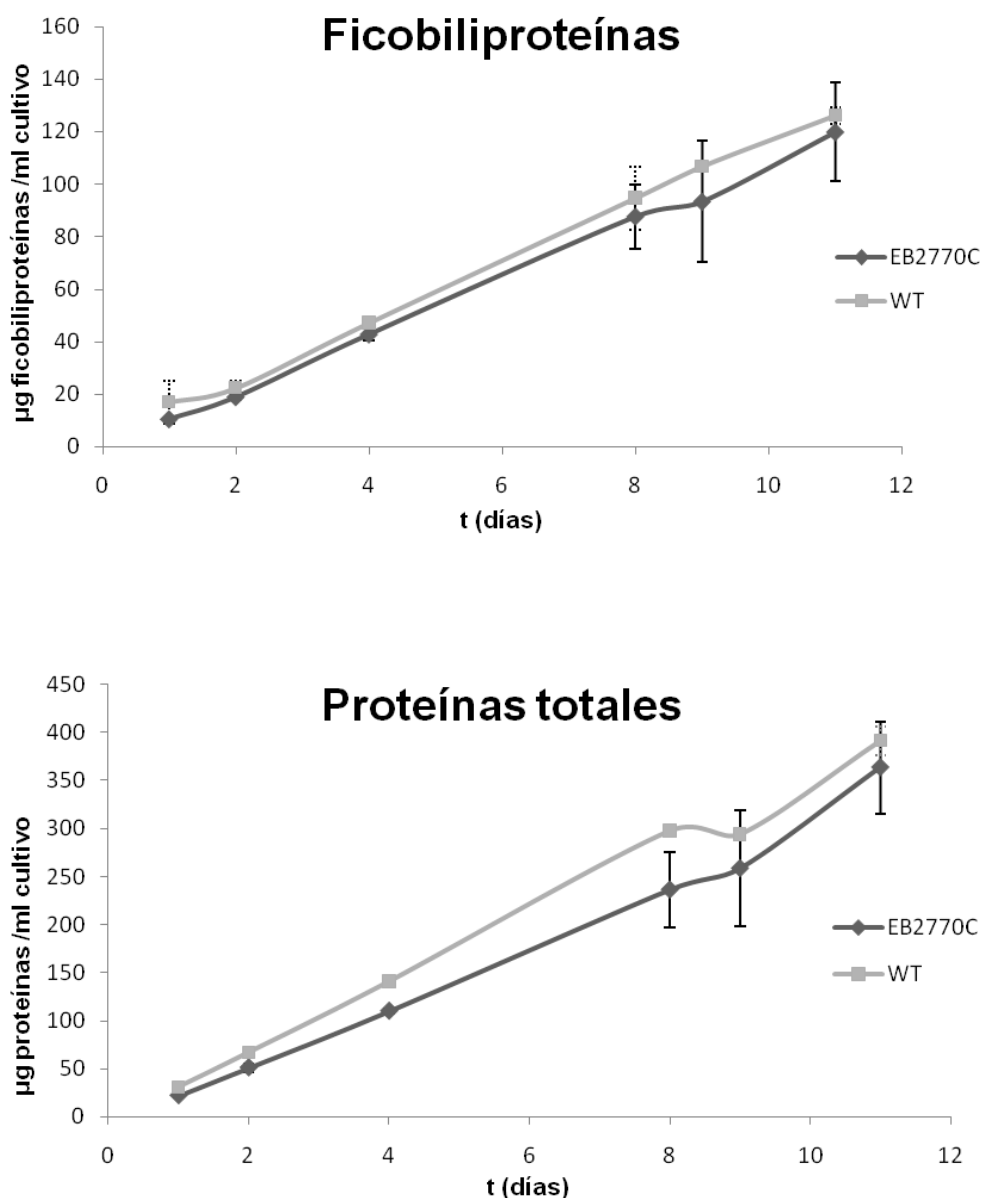


Figura 4.4.1.c.- Concentración de ficobiliproteínas y proteínas totales a lo largo del crecimiento del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120 Las líneas verticales se refieren a la desviación estándar de dos experimentos independientes en la estirpe EB2770C (negro) y WT (gris).

Parece que la estirpe mutante EB2770FurC contiene menos ficobiliproteínas que la wild-type. Pero, EB2770C también tiene menos proteínas totales por lo que para obtener más información podemos relacionar las ficobiliproteínas con las proteínas totales en forma de %. También se hizo esto para la clorofila y los carotenoides como se muestra a continuación.

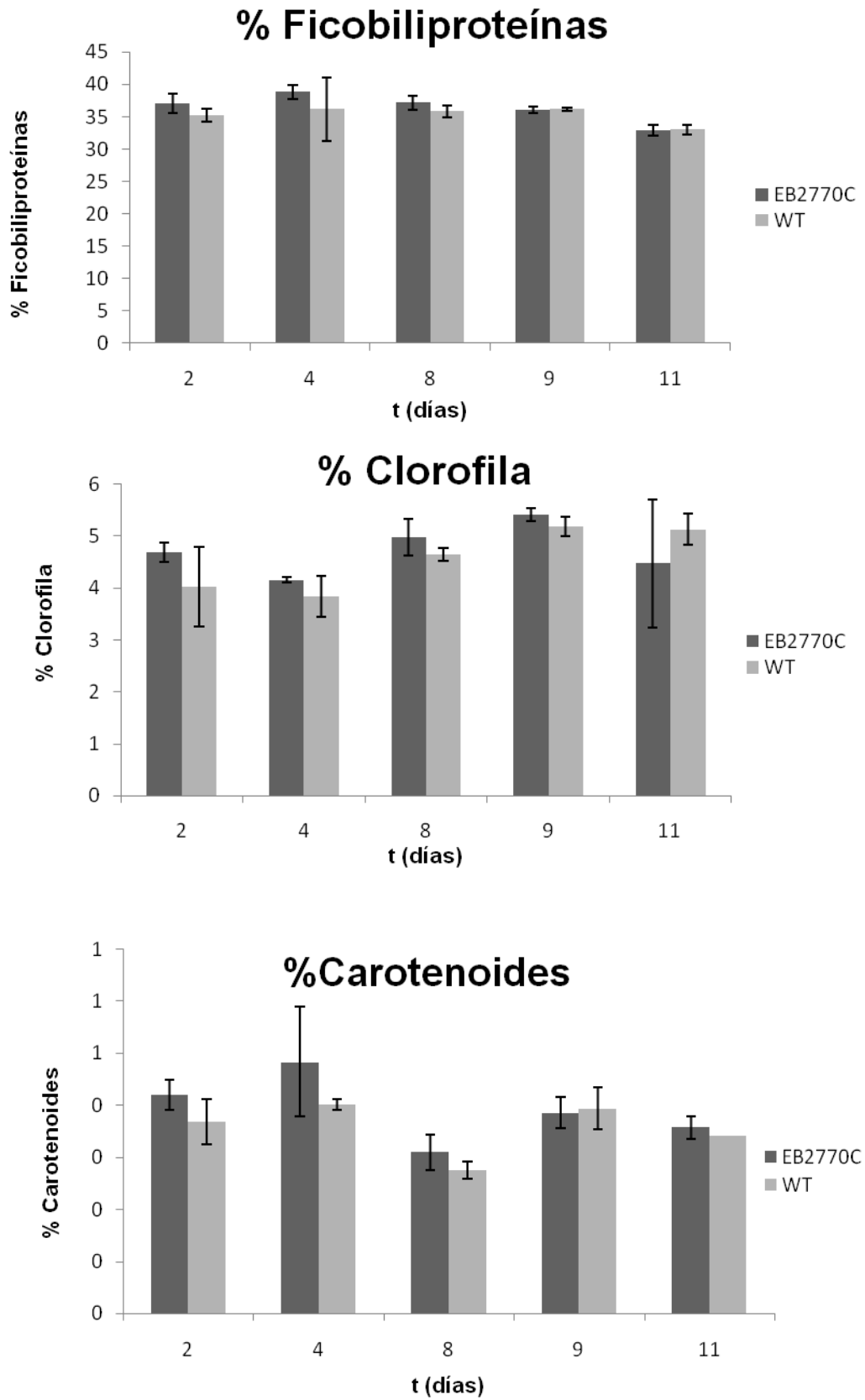


Figura 4.4.1.d.- Porcentaje de ficobiliproteínas, clorofila y carotenoides a lo largo del crecimiento del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120.

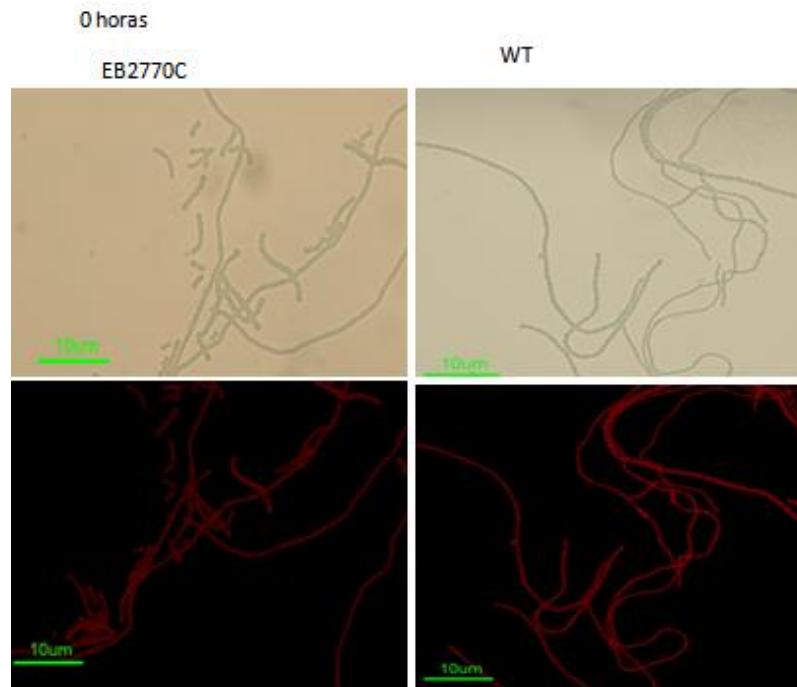
A pesar de que el mutante parecía tener menos ficobiliproteínas que la estirpe WT, fijándonos en la ratio, se ve que la estirpe mutante tiene más porcentaje de estas proteínas. Es decir, aunque la concentración de proteínas totales (tener en cuenta que la DO de ambas estirpes es el mismo por tanto debería contener la misma cantidad de proteínas) y ficobiliproteínas son menores en la estirpe EB2770C que en la WT; la relación es mayor. Esto se podría interpretar como que la estirpe EB2770C sintetiza menos proteínas en general, pero esta disminución no afecta tanto a las ficobiliproteínas. Lo mismo ocurre con los demás pigmentos analizados. La diferencia de parámetros entre WT y EB2770C es siempre mayor en la fase exponencial.

Este resultado, junto con el del pull-down (FurC une ficobiliproteínas), parece indicar que la sobreexpresión de FurC podría estabilizar a las ficobiliproteínas impidiendo que se degraden tanto como las demás proteínas. Esta estabilización también afectaría a la clorofila, ya que está formando los fotosistemas a los que se unen los ficobilisomas. En cuanto a los carotenoides, aumentarían porque forman parte del aparato fotosintético. Esto tendría consecuencias en un aumento de la eficiencia fotosintética que debería ser comprobado con futuros experimentos.

4.4.2. Comportamiento en deficiencia de nitrógeno

Para terminar de enlazar los resultados obtenidos, se analizó qué ocurría con las ficobiliproteínas en la estirpe EB2770C cuando estaba frente a una deficiencia de nitrógeno. Este análisis venía motivado por el hecho de que el mRNA de *furC* se transcribía más en estas condiciones. Para ello se eliminó el nitrato del medio en la fase exponencial de cultivo de la estirpe mutante, y de manera simultánea, en la wild-type. Se tomaron fotografías a distintos tiempos después de la retirada de nitrógeno con el microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-Fluorescence para ver si había diferencias en el patrón de diferenciación a heterocistos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

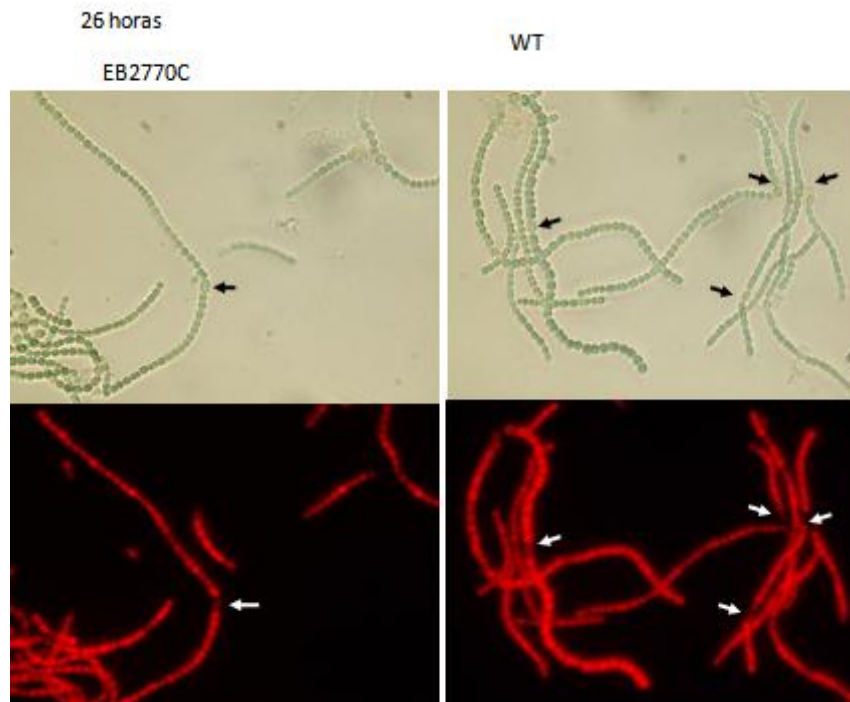


En esta imagen a tiempo cero, se ve que la estirpe mutante y la WT se diferencian en la longitud de las cadenas. EB2770C tiene filamentos largos como la WT pero también muchos cortos. En cuanto al color y fluorescencia son similares.

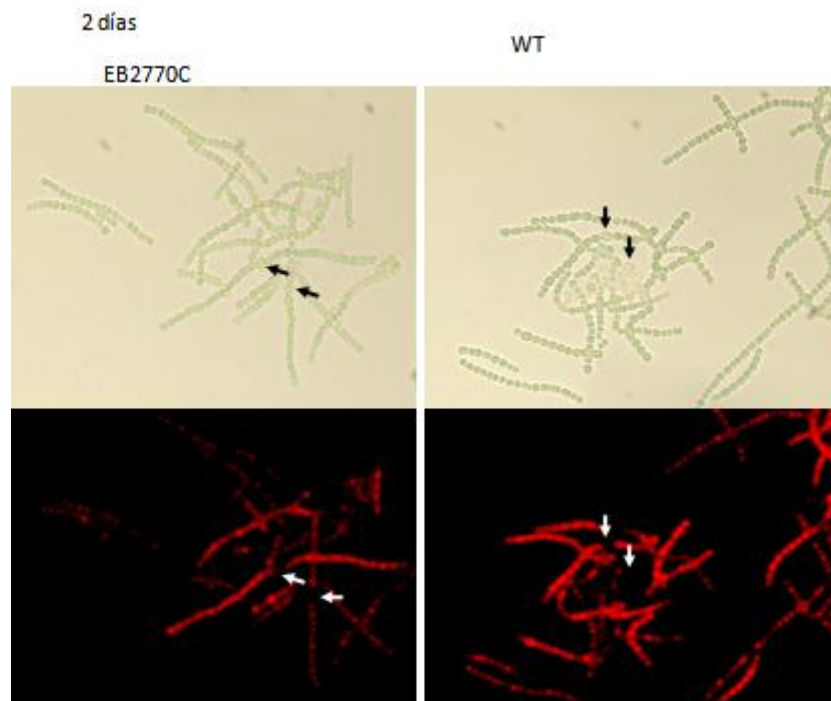


Tras seis horas en ausencia de nitrato en ambas estirpes aún no se aprecian heterocistos. La longitud de las cadenas se ha igualado, probablemente por las condiciones del cultivo (el burbujeo hace que se rompan más cadenas).

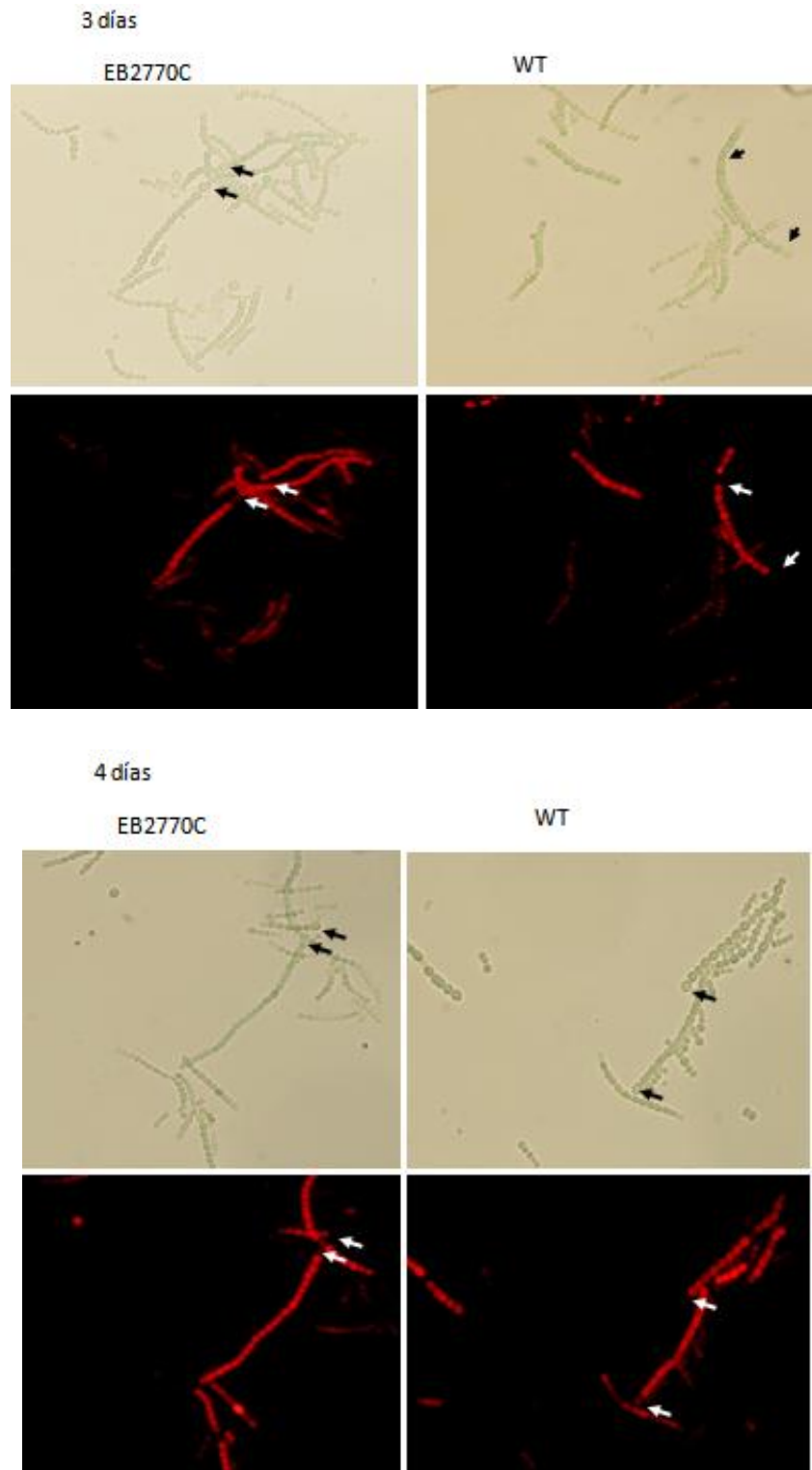
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tras 26 horas sin nitrato comienzan a apreciarse diferencias ya que en la estirpe WT aparecen heterocistos (señalados con flechas), según el patrón habitual (uno por cada 10-20 células vegetativas). Vemos que en una cadena hay dos heterocistos separados por 13 células vegetativas. Sin embargo, en la mutante la frecuencia de aparición de heterocistos es menor.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tras dos, tres y cuatro días ya no se observan diferencias entre la estirpe mutante y WT. Parece haber una diferencia si nos fijamos en el día 2, la estirpe mutante tiene menos intensidad de fluorescencia; puede que esto esté relacionado de nuevo con las ficobiliproteínas, que son las responsables de la autofluorescencia de *Anabaena*. Además, a simple vista el cultivo de la estirpe mutante tiene un color distinto (más amarillo) que la wild-type (**Figura 4.4.2.a**).

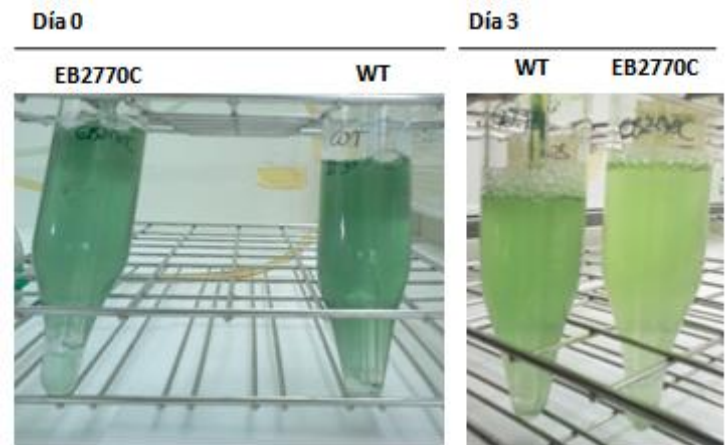


Figura 4.4.2.a- Evolución de un cultivo del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120 cuando se le elimina el nitrato del medio de cultivo.

Por esta observación y todos los resultados anteriores se decidió medir las ficobiliproteínas de estos cultivos.

Tabla 4.4.2.- Evaluación de la concentración de pigmentos en las estirpes *Anabaena* sp. 7120 y EB2770C a lo largo del crecimiento cuando se elimina el nitrato del medio de cultivo.

t (días)	DO 750		Clorofila (µg/ml cultivo)		Ficobiliproteínas (µg/ml cultivo)		Proteínas totales (µg/ml cultivo)		% Ficobiliproteínas	
	EB2770C	WT	EB2770C	WT	EB2770C	WT	EB2770C	WT	EB2770C	WT
0	0,42	0,42	3,41	3,62	28,19	28,54	42,73	41,89	65,97	68,120
3	0,53	0,70	2,27	2,91	8,15	14,76	11,57	34,07	70,47	43,34

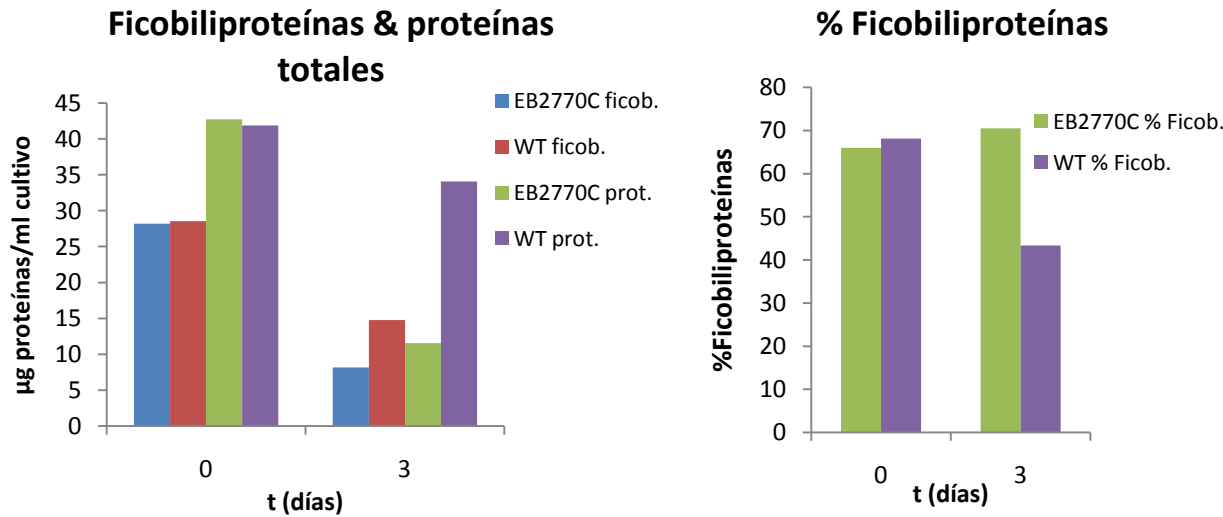


Figura 4.4.2.b.- Evolución de las ficobiliproteínas y proteínas del mutante EB2770C en comparación con la cepa wild-type PCC 7120 cuando se le elimina el nitrato del medio de cultivo.

En los datos obtenidos vemos que, efectivamente, la estirpe EB2770C tiene muchas menos ficobiliproteínas totales, por ello se aprecia un color más amarillo. Pero también es cierto que tiene muchas menos proteínas totales y densidad óptica a 750 nm. Por eso, es más informativo prestar atención al dato del porcentaje de ficobiliproteínas. Este dato nos dice que la estirpe mutante, a pesar de haber crecido peor y tener menos proteínas totales, tiene mucho más porcentaje de ficobiliproteínas. Es decir, la estirpe mutante degrada menos las ficobiliproteínas que las demás proteínas.

Este resultado concordaría con el obtenido en la curva de crecimiento, FurC estabiliza a las ficobiliproteínas. Este hecho podría ser perjudicial para *Anabaena* cuando se elimina el nitrógeno, ya que le faltarían metabolitos procedentes de las ficobiliproteínas para realizar con éxito la diferenciación a heterocisto. Esto provocaría que sobrevivieran menos células, y por ello vemos menos densidad óptica y menos proteínas totales. Así se explicaría también porqué a las 26 horas de eliminar el nitrógeno vemos menos heterocistos en la estirpe mutante que en la WT. Que se observe esta diferencia a las 26 horas, podría indicar que FurC puede ejercer su papel de forma más predominante en los estadios intermedios de la diferenciación a heterocisto.

4.4.3. Análisis de la transcripción de *HetR* y *NtcA*.

Por todos los resultados que se habían obtenido, se decidió realizar RT-PCR sobre el DNA del mutante y *Anabaena sp.* 7120 para ver si había alguna diferencia en los principales reguladores del metabolismo del nitrógeno en *Anabaena*: *HetR* (regulador de la formación del heterocisto) y *NtcA* (sensor del balance carbono: nitrógeno).

Para ello se usaron 0,5 µl de cDNA para *mnpB*, *NtcA* y *HetR*; y 1 µl para amplificar *furC*. El cDNA provenía de un cultivo de *Anabaena* y del mutante en medio BG11 con 1,35 mg/ml de NO₃⁻. El resultado se muestra en la **figura 4.4.3**. Como vemos, *furC* se transcribe más en EB2770C; sin embargo, *NtcA* se transcribe muy poco en ambas estirpes y *HetR* no se transcribe en ninguna de las dos.

Es decir, la mayor expresión de *furC* no parece afectar a la transcripción de los reguladores generales del nitrógeno *HetR* y *NtcA*.

Sería interesante continuar este análisis transcripcional con muchos otros genes como *NbIA*. La proteína NbIA es la encargada de degradar a las ficobiliproteínas (Baier et al. 2004) en el proceso de diferenciación a heterocisto. Otros genes

interesantes a estudiar serían los que codifican para ficobiliproteínas y linker asociados a estas, ya que FurC se une a los linker.

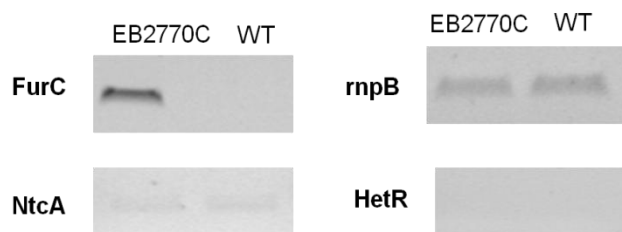


Figura 4.4.3.- Comprobación de la transcripción de *furC*, *HetR*, *NtcA* y *rnpB* en *Anabaena* WT y en EB2770C en medio BG11 con NO_3^- . En la figura se muestra el resultado de la PCR sobre cDNA con los oligos para amplificar los genes citados.

4.5. Modelo de acción de FurC

Con los resultados obtenidos se podría establecer la siguiente hipótesis: cuando hay déficit de ficobiliproteínas (por las condiciones ambientales o la degradación que se produce en déficit de nitrógeno) se activa la transcripción de *furC*. FurC se traduce y se une a dos linker del ficobilisoma. Con esta unión estabiliza al ficobilisoma y evita su degradación. Como consecuencia de esta estabilización también aumentan los pigmentos fotosintéticos como la clorofila o los carotenoides. Esto es debido a que el ficobilisoma está asociado a al fotosistema II y participa activamente en la fotosíntesis ejerciendo como antena captadora de fotones.

En posteriores investigaciones se deberá concretar que señal es la que induce la transcripción de *furC*. Podría tratarse de un producto de degradación de ficobiliproteínas o de alguna otra señal celular como respuesta al incremento de la ratio carbono/nitrógeno.

Con la **figura 4.5** se resumiría este modelo de acción:

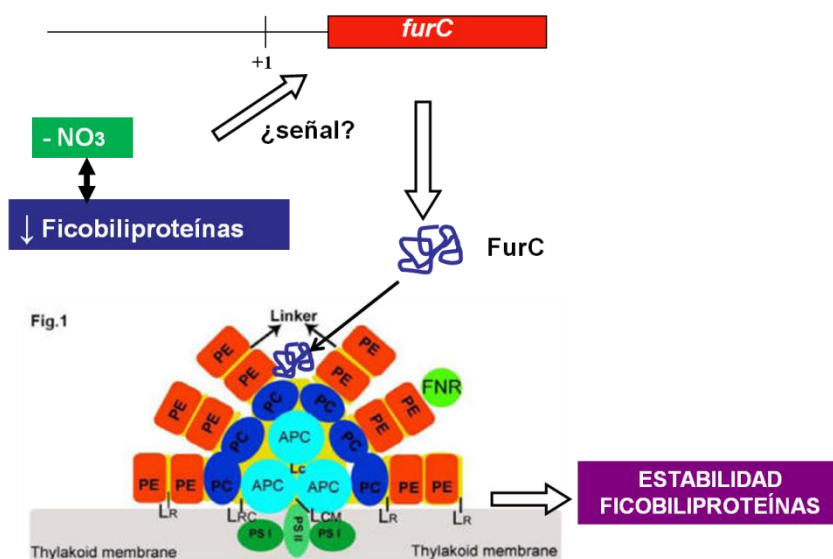


Figura 4.5.- Modelo propuesto para la acción de FurC. Cuando hay déficit de ficobiliproteínas la transcripción de FurC se activa, dicha proteína se une a los linker de los ficobilisomas y los estabiliza.

5. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo de investigación las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. La transcripción de *furC* en *Anabaena* WT se induce en déficit de nitrógeno combinado. Esta inducción es mayor a las 6 horas de haber retirado el nitrógeno.
2. FurC se une al péptido linker del ficobilisoma de 7.8 kDa asociado a aloficocianina y al péptido linker del ficobilisoma de 34.5 kDa asociado a ficoeritrocianina. Dos proteínas que actúan como linker estabilizando los ficobilisomas.
3. Se ha logrado sobreexpresar FurC en *Anabaena* sp. PCC7120 a partir del plásmido pAM2770FurC. Como resultado se ha obtenido el mutante de *Anabaena* sp., al que se le ha llamado EB2770FurC.
4. El mutante EB2770C tiene un porcentaje mayor de ficobiliproteínas, carotenoides y clorofila, con respecto a las proteínas totales, que la estirpe wild-type. Aunque el tiempo de duplicación es el mismo.
5. El mutante EB2770C, en déficit de nitrato, tiene mayor porcentaje de ficobiliproteínas, pero crece peor y tiene menos proteínas totales que la estirpe wild-type.
6. El mutante EB2770C, a las 6 horas de haber retirado el nitrato del medio de cultivo tiene menos heterocistos que la estirpe wild-type.
7. El mutante EB2770C en presencia de nitrato no presenta diferencias en la transcripción de *hetR* y *ntcA* con respecto a la estirpe wild-type.
8. Todos estos resultados nos han permitido proponer un modelo de actuación de FurC en *Anabaena* sp. PCC7120. Este modelo se detalla en el apartado 4.5.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams DG. (2000) *Heterocyst formation in cyanobacteria*. Curr Opin Microbiol. ; 3(6):618-24.
2. Ausubel F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A. and Struhl,K. (2000) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2. John Wiley&Sons, New York, NY.
3. Baier K, Lehmann H, Stephan DP, Lockau W. (2004) *NblA is essential for phycobilisome degradation in Anabaena sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts*. Microbiology. ;150(Pt 8):2739-49.
4. Bryant DA, Stirewalt VL, Glauser M, Frank G, Sidler W, Zuber H. (1991) *A small multigene family encodes the rod-core linker polypeptides of Anabaena sp. PCC7120 phycobilisomes*. Gene.;107(1):91-9.
5. Buikema WJ, Haselkorn R. (2001) *Expression of the Anabaena hetR gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions*.ProcNatlAcadSci U S A.;98(5):2729-34.
6. Cavalier-Smith T. (2002) *The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial mega classification*. Int J Syst Evol Microbiol.; 52(Pt 1):7-76.
7. Davies, B.H. (1976). *Carotenoids*. In T.W. Goodwin (ed.) Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Vol.2. Academic Press, London. United Kingdom. pp. 38-155.
8. Ducret A, Sidler W, Wehrli E, Frank G, Zuber H. (1996) *Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. Eur J Biochem.;236(3):1010-24.
9. Elhai J, Vepritskiy A, Muro-Pastor AM, Flores E, Wolk CP. (1997)*Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of Anabaena sp. strain PCC 7120*. J Bacteriol.;179(6):1998-2005.
- 10.Elhai J, Wolk CP. *Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria*. (1988) MethodsEnzymol. ;167:747-54.

11. Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1998). *Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of Escherichia coli to arrays of the GATAAT sequence*. J Mol Biol 283: 537–547.
12. Flores E, Herrero A. (2010) *Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria*. Nat Rev Microbiol.; 8(1):39-50.
13. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A. (2003). *ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis* Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.
14. Glazer, A.N.(1976)*Phycocyanins* . In Photochemical and Photobiological Reviews. Edited by Smith, K.C. pp. 71 – 115. Plenum Press, New York.
15. Golden, J. W. and Yoon, H. S. (2003). *Heterocyst development in Anabaena*. Curr. Opin. Microbiol. 6:557-5563.
16. Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. (1993) *The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions*. Microbiol Rev.; 57(3):725-49.
17. Guan X, Qin S, Zhao F, Zhang X, Tang X.(2007)*Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution*. Int J Biol Sci.;3(7):434-45.
18. Hernández J.A., López-Gomollón S., Bes M.T., Fillat M.F., Peleato M.L. (2004). *Three fur homologues from Anabaena sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition*. FEMS MicrobiolLett.
19. Hernández, J.A., López-Gomollón, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M.T., Peleato, M.L. and Fillat., M.L. (2006). *Interaction of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 with DNA: A Reducing Environment and the Presence of Mn²⁺ are Positive Effectors in the Binding to isiB and furA Promoters*. Biometals.19(3):259-68
20. Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. (2001) *Nitrogen control in cyanobacteria*. J Bacteriol. ;183(2):411-25.
21. Horiuchi M, Nakamura K, Kojima K, Nishiyama Y, Hatakeyama W, Hisabori T, Hihara Y. (2010) *The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria*. Biochem J. ;431(1):135-40.

22. Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P. et al. (2001). *Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120*. DNA Res. 8, 205–213.
23. López-Gomollón S, Hernández JA, Wolk CP, Peleato ML, Fillat MF. (2007) *Expression of furA is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of Anabaena sp. PCC 7120*. Microbiology. ;153
24. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. (2009) *New insights into the role of Fur proteins: FurB (Al2473) from Anabaena protects DNA and increases cell survival under oxidative stress*. Biochem J. 15; 418(1):201-7.
25. Mackinney, G. (1941). *Absorption of light by chlorophyll solutions*. J. Biol. Chem. 140: 315-322.
26. Marteyn B, Domain F, Legrain P, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. (2009) *The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in Synechocystis PCC6803*. Mol Microbiol.;71(2):520-32.
27. Meeks, J. C. and Elhai, J. (2002). *Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:94-121.
28. Ohmori, M., Ikeuchi, M., Sato, N., Wolk, P., Kaneko, T., Ogawa, T., Kanehisa, M., Goto, S. et al. (2001). *Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium anabaena sp. strain PCC 7120*. DNA Res. 8(6):271-84
29. Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. and Vasil, M.L. (2003). *Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator*. Mol. Microbiol. 47, 903– 915.
30. Rippka R, Deruelles J, Waterbury J.B, Herdman M, and Stanier R.Y. (1979) *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria* J Gen Microbiol March 111:1-61
31. Rippka R. (1988) *Isolation and purification of cyanobacteria*. MethodsEnzymol. ; 167:3-27.

32. Stal, L. J. and Moezelaar, R. (1997). *Fermentation in cyanobacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 21: 179–211.
33. Tanigawa R, Shirokane M, Maeda Si S, Omata T, Tanaka K, Takahashi H. (2002) *Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of Synechococcus sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. ; 99(7):4251-5
34. Wisén S, Sjögren T, Olin B, Mannervik B.(2004) *Purification, crystallization and preliminary X-ray data of the transcription factor NtcA from the cyanobacterium Anabaena PCC 7120*. Acta Crystallogr D BiolCrystallogr. ; 60(Pt 5):923-5.
35. Yamanaka, G., and A. N. Glazer. (1980). *Dynamic aspects of phycobilisome structure. Phycobilisome turnover during nitrogen starvation in Synechococcus sp.* Arch. Microbiol. 124:39-47.