

# Estudio de la interacción entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120

Study of the interaction between the Fur proteins of *Anabaena* sp. PCC7120

Irene Oliván Muro



Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología dirigido por

Emma Sevilla Miguel



## Índice

1. Resumen .....	1
Abstract .....	1
2. Introducción .....	2
2.1. Las cianobacterias .....	2
2.2. Homeostasis de metales y estrés redox .....	2
2.3. La superfamilia de proteínas FUR .....	2
2.4. Proteínas FUR en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	3
2.5. Las interacciones proteína-proteína .....	4
2.6. Interacciones entre las proteínas Fur de <i>Anabaena</i> sp. PCC7110 .....	4
3. Objetivos.....	5
4. Materiales y métodos.....	5
4.1. Ensayo de doble híbrido.....	5
4.1.1. Cepas empleadas y cultivo .....	5
4.1.2. Ensayo de expresión de $\beta$ -galactosidasa.....	6
4.1.3. Análisis estadístico .....	6
4.2. Purificación de FurB de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 .....	7
4.2.1. Transformación de células <i>E.coli</i> BL21-Gold con el plásmido pET-28a-FurB por choque térmico .....	7
4.2.2. Ensayo de sobreexpresión.....	7
4.2.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	7
4.2.4. Obtención de biomasa de <i>E. coli</i> BL21-Gold con el plásmido pET28a-FurB	7
4.2.5. Obtención del extracto crudo por sonicación y purificación por IMAC .....	7
4.2.6. Análisis y cuantificación de FurB de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 purificada .....	8
4.3. Calorimetría de titulación isotérmica.....	8
4.4. Dicroísmo circular.....	9
5. Resultados.....	9
5.1. Estudio de las interacciones entre los parálogos FUR de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 por ensayos de doble híbrido .....	9
5.1.1. Estudio de la interacción FurC-FurA por doble híbrido .....	9
5.1.2. Estudio de la interacción FurC-FurB por doble híbrido .....	13
5.2. Estudio del efecto del NaCl en la interacción entre las proteínas Fur de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	16
5.2.1. Purificación y cuantificación de FurB.....	17
5.2.2. Preparación de las muestras de FurA y FurC .....	17
5.2.3. Análisis de la interacción FurC-FurA y FurC-FurB en presencia de NaCl por ITC.....	17

5.3. Estudio de la alteración estructural causada por la interacción entre las proteínas Fur de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120.....	18
6. Discusión .....	20
6.1. Las proteínas FurC y FurB interaccionan <i>in vivo</i> .....	20
6.2. Las proteínas FurC y FurA no interaccionan <i>in vivo</i> en las condiciones probadas en este trabajo .....	21
6.3. Un aumento en la fuerza iónica del medio es capaz de reducir la interacción <i>in vitro</i> de FurC/FurB y de FurC/FurA.....	22
6.4. La interacción entre FurC/FurB y FurC/FurA promueve un cambio en su estructura secundaria. .....	22
7. Conclusiones .....	23
Conclusions .....	23
8. Bibliografía.....	24

## Abreviaturas

A/T:	adenina y timina
Abs:	absorbancia
ADP:	adenosín difosfato
AMP:	adenosín monofosfato
ATP:	adenosín trifosfato
BACTH:	doble híbrido bacteriano
BSA:	albúmina sérica bovina
cAMP:	adenosín monofosfato cíclico
CAP:	proteína activadora de catabolitos
CD:	dicroísmo circular
cm:	centímetros
C-terminal:	carboxilo terminal
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DO:	densidad óptica
DTT:	1,4-ditiotreitol
g:	gramos
GndCl:	cloruro de guanidinio
h:	horas
His-Tag:	cola de histidinas
IMAC:	cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IPTG:	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido
ITC:	calorimetría de titulación isotérmica
kDa:	Kilodalton
L:	litros
LB:	medio de cultivo Luria-Bertani
M:	concentración molar
M9:	medio de cultivo M9
mA:	miliamperios
MCO:	oxidación catalizada por metales
mg:	miligramos
min:	minutos
mL:	mililitros
mM:	concentración milimolar
nm:	nanómetros
ns:	no significativo
N-terminal:	amino terminal
O/N:	overnight (toda la noche)
°C:	grados centígrados
ONPG:	orto-nitrofenil- $\beta$ -galactósido
PCC:	Colección Pasteur de cultivos de cepas de cianobacterias
plac:	promotor del gen <i>lac</i>
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA:	persulfato de amonio
RNA:	ácido ribonucleico

ROS:	especies reactivas de oxígeno
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de acrilamida con SDS
sp. :	especie
TCA:	ácido triclorocarboxílico
TEMED:	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Unids.:	unidades
v/v:	relación volumen/volumen
X-Gal:	bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido
$\beta$ -GAL:	$\beta$ -galactosidasa
$\Delta$ cya:	delección del gen <i>cya</i>
$\epsilon$ :	coeficiente de extinción molar
$\mu$ g:	microgramos
$\mu$ L:	microlitros
$\mu$ M:	concentración micromolar

## 1. Resumen

La regulación transcripcional permite a los seres vivos adaptar su expresión génica en respuesta a diferentes señales ambientales. La superfamilia de proteínas bacterianas FUR constituye un grupo de reguladores transcripcionales implicados en procesos como la homeostasis de metales o la defensa redox, incluyendo proteínas como Fur (regulador de la homeostasis de hierro), Zur (regulador de la homeostasis de zinc) y PerR (regulador de la respuesta a estrés por peróxido). La cianobacteria modelo *Anabaena* sp. PCC7120 presenta tres parálogos FUR, vitales en su regulación transcripcional: FurA (homólogo Fur), FurB (homólogo Zur) y FurC (posible homólogo PerR). Aunque cada una ejerce una acción individual, previamente se había descrito una interregulación de su expresión y la interacción *in vitro* de FurC tanto con FurA como con FurB.

En este trabajo se ha avanzado en la caracterización de la interacción entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120, comenzando por su análisis *in vivo* en diversas condiciones por ensayos de doble híbrido. Los resultados indican que FurB y FurC interaccionan *in vivo* en ciertas condiciones, independientemente del estado redox. En cambio, no se ha observado interacción *in vivo* entre FurA y FurC en las condiciones ensayadas.

También se ha estudiado el efecto de la adición de cloruro sódico sobre la interacción *in vitro* por calorimetría de titulación isotérmica, observándose una reducción de su afinidad tanto para FurC/FurA como para FurC/FurB, lo que sugeriría una posible implicación de fuerzas electrostáticas en estas interacciones. Finalmente, estudios de dicroísmo circular han permitido evaluar la alteración estructural de estas proteínas al interaccionar, observándose cambios conformatacionales hacia un mayor contenido en arrollamientos de  $\alpha$ -hélices.

## Abstract

Transcriptional regulation allows living beings to adapt their genic expression to their environment by sensing different signals. The bacterial FUR superfamily consists of transcriptional regulators which participate in processes such as metal homeostasis or redox defence, including proteins such as Fur (iron homeostasis regulator), Zur (zinc homeostasis regulator) and PerR (peroxide stress response regulator). The cyanobacterial model strain *Anabaena* sp. PCC7120 contains three FUR paralogues, with a key impact on its transcriptional regulation: FurA (Fur homologue), FurB (Zur homologue) and FurC (potential PerR homologue). Although each protein has its own role, a crossregulation and an *in vitro* interaction of FurC with both FurA and FurB have been previously described.

This work has contributed to the characterization of the interaction between these Fur proteins of *Anabaena* sp. PCC7120, starting with *in vivo* two-hybrid experiments in different conditions. The results show that FurB and FurC interact *in vivo* under certain circumstances, independently of their redox state. However, no *in vivo* interaction between FurA and FurC has been observed under the tested conditions.

Furthermore, the effect of sodium chloride on the interaction has been studied *in vitro* by isothermal titration calorimetry, revealing it reduces the affinity of both FurC/FurA and FurC/FurB. This suggests the involvement of electrostatic forces in their binding. Lastly, the impact of such interactions on the structure of these proteins was studied by circular dichroism, revealing conformational changes with an enrichment in coiled-coil motifs.

## 2. Introducción

### 2.1. Las cianobacterias

Consideradas como responsables de la oxigenación de los océanos y la atmósfera hace aproximadamente 2,4 Giga-años, las cianobacterias son organismos fotosintéticos oxigénicos presentes en una gran variedad de ambientes, colonizando aguas continentales, océanos y suelos. Se trata de organismos procariotas, pertenecientes al dominio *Bacteria* de Woese, y se clasifican como gram-negativas (1).

Debido a su capacidad de fijar CO<sub>2</sub> atmosférico y liberar O<sub>2</sub>, tienen gran impacto sobre los ciclos biogeoquímicos. Las cianobacterias marinas son consideradas importantes productores primarios y, por tanto, forman parte de la base de la cadena trófica (2). Debido a su gran versatilidad, se les pueden dar numerosas aplicaciones: como biofertilizantes, en alimentación humana, en biorremediación y como productores de compuestos de interés, entre otras (3). Sin embargo, su proliferación descontrolada en forma de “blooms” puede tener efectos negativos, ya que desplazan a la microbiota autóctona y algunas de ellas producen toxinas (1).

### 2.2. Homeostasis de metales y estrés redox

Los metales son micronutrientes necesarios para la vida, pero tanto su exceso como su defecto pueden ser nocivos, por lo que es importante mantener su concentración intracelular a niveles adecuados. El cinc tiene función estructural en ácidos nucleicos y proteínas, como la RNA polimerasa o la anhidrasa carbónica, así como de cofactor de diversas enzimas (4). Pese a su importancia, es poco abundante en la naturaleza, lo que hace necesario controlar su homeostasis. Por el contrario, el hierro es abundante, pero poco biodisponible debido a su baja solubilidad. A pesar de ello, es clave en catálisis enzimática, fijación de nitrógeno, fotosíntesis y respiración (5).

Metales como el cinc y el manganeso participan en el mantenimiento del equilibrio redox, mientras que el hierro libre (Fe<sup>+2</sup>) potencia la toxicidad del oxígeno al catalizar la reacción de Fenton: conversión de peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al altamente reactivo radical hidroxilo (6). Las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se producen a consecuencia del metabolismo aeróbico y el estrés oxidativo, pueden causar daños celulares, en especial sobre proteínas que contienen hierro (6). Por tanto, el efecto de la alteración de la homeostasis de metales y el estrés redox sobre el funcionamiento celular están íntimamente interrelacionados, lo que requiere una regulación integrada. En procariotas, una familia de proteínas fuertemente implicada en la regulación de la homeostasis de metales y la respuesta a estrés oxidativo es la superfamilia FUR.

### 2.3. La superfamilia de proteínas FUR

La superfamilia de proteínas FUR está formada por reguladores transcripcionales procariotas de entre 13 y 20 kDa. Su estructura consiste en un dominio de unión a DNA N-terminal de tipo *winged-helix*, y un dominio de dimerización C-terminal. Presentan un dominio característico de 120 aminoácidos con un motivo rico en histidinas, HHHXHXXCXXC, y pueden presentar motivos CXXC en C-terminal. También presentan hasta 3 sitios de unión a metal, siendo los más conservados un sitio estructural, generalmente ocupado por cinc, y un sitio regulador que media la unión a DNA (12). De forma general, actúan como represores transcripcionales homodiméricos dependientes de cofactores metálicos, uniéndose a secuencias de DNA palindrómicas ricas en A/T en los promotores de los genes que regulan e impidiendo su transcripción (8). Aunque su

forma funcional sea homodimérica, algunas forman complejos oligoméricos estables (7). Esta familia incluye a Fur (ferric uptake regulator, la primera en ser descrita), Zur (zinc uptake regulator) y PerR (peroxide stress response regulator), Mur (manganese uptake regulator), Irr (iron-responsive regulator), Nur (nickel uptake regulator) (5).

La proteína Fur contiene hierro como metal regulador. Fue originalmente descrita como proteína reguladora de la homeostasis del hierro (8), pero también está implicada en la defensa contra el estrés oxidativo y el metabolismo energético. Por su papel en la expresión de determinantes de virulencia, se considera una potencial diana de nuevos antimicrobianos (9). Aunque suele actuar como represor transcripcional homodimérico en unión a  $\text{Fe}^{+2}$ , puede actuar como activador (5) o sin su  $\text{Fe}^{+2}$  correpresor (10).

Una segunda subclase sería Zur, que contiene cinc regulador y estructural y actúa como regulador de la homeostasis del cinc (11). Al igual que Fur, suele funcionar como represor transcripcional dependiente de metales, bloqueando el acceso de la RNA polimerasa a sus promotores diana, pero también puede actuar como activador (12).

Otra proteína destacable de la familia FUR es PerR, implicada en la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo. Su forma de actuación difiere de la de Fur y Zur, ya que no sensa metales, sino  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y su hierro regulador ejecuta un proceso de oxidación catalizada por metales (MCO) de una histidina. Esto conlleva la liberación de sus dianas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . También puede asociarse a  $\text{Mn}^{+2}$  de forma competitiva en el sitio de unión a  $\text{Fe}^{+2}$ , volviéndose insensible a MCO (13).

#### 2.4. Proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCC7120

*Anabaena* sp. PCC7120 es una cepa perteneciente al género de cianobacterias filamentosas diazotróficas *Anabaena*, empleada como cepa modelo. Gracias al motivo conservado HHXHXXCXXC, se identificaron tres parálogos FUR en su genoma: FurA (all1691), FurB (all2473) y FurC (alr0957) (14).

FurA es el homólogo a Fur, descrito en esta cianobacteria como regulador global de la expresión ya que controla directa o indirectamente hasta un tercio del genoma, incluyendo genes relacionados con la homeostasis del hierro, estado redox, fotosíntesis, diferenciación de heterocistos y metabolismo de nitrógeno (15). FurA difiere de otras proteínas Fur en que no contiene cinc estructural y presenta actividad disulfuro reductasa, pudiendo tener una función adicional como sensor redox (16). Su expresión responde a la disponibilidad de metales, estado redox, su RNA antisentido y niveles de nitrógeno, expresándose a alto nivel en pro-heterocistos y heterocistos maduros (17).

En cuanto a FurB, se describió como el homólogo a Zur. Ejerce su función principal en el control de la expresión de genes relacionados con la homeostasis de cinc, pero también regula genes de respuesta a estrés oxidativo. Además de su papel como represor transcripcional, se ha relacionado con la protección contra estrés oxidativo por medio de la protección por unión directa al DNA de forma inespecífica (18).

FurC es el parálogo menos conocido, y podría tratarse del homólogo de PerR (19). Hasta ahora se ha publicado que participa en la respuesta a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , regulando la expresión de enzimas antioxidantes como la sulfirreductina *srxA* y varias peroxirreductinas (21). Estas últimas son un tipo de peroxidasa, consideradas como las principales encargadas de la detoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en *Anabaena* sp. PCC7120. Además, recientemente se ha descrito que FurC participa en la activación de genes implicados en el ciclo de reparación del fotosistema II, sensible al daño foto-oxidativo y la acción de ROS (20).

## 2.5. Las interacciones proteína-proteína

La fisiología celular depende de las funciones que ejercen las proteínas, pero dichas proteínas frecuentemente no actúan de forma individual y aislada: la interacción física entre proteínas modula, o incluso condiciona, su función. Esta interacción incluye en ocasiones la formación de complejos de mayor peso molecular, como homodímeros (complejos de subunidades proteicas idénticas) y heterodímeros (complejos formados por diferentes subunidades proteicas) (21).

Existen interacciones obligadas donde las proteínas no existen independientemente, que frecuentemente implican uniones permanentes y de tipo covalente. Las interacciones no obligadas se corresponden a proteínas que pueden ser funcionales independientemente, pero establecen interacciones generalmente transitorias y de tipo no-covalente. Las interacciones covalentes se basan principalmente en puentes disulfuro entre cisteínas, mientras que las no covalentes pueden responder a la atracción electrostática entre zonas de carga opuesta, puentes de hidrógeno entre grupos amino, hidroxilo o sulfhidrilo; fuerzas de *Van der Waals* entre zonas no polares o interacciones entre zonas hidrofóbicas que resulta favorable ocultar del solvente (22).

Los complejos proteicos transitorios tienen gran relevancia en señalización y regulación celular: distintos factores ambientales pueden alterar la afinidad de sus miembros, induciendo la formación de complejos o su disociación, con sus consecuentes cambios funcionales (21). En cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC6803 se han descrito miles de potenciales interacciones distintas (23) y existen ejemplos sumamente interesantes y bien caracterizados en *Anabaena* sp. PCC7120, como el de PipX, que en función del balance de nitrógeno celular se compleja con diferentes proteínas. En suficiencia de nitrógeno interacciona con PII, junto a otras como la N-acetil-glutamato quinasa, encargada de la formación de reservas de nitrógeno. Por el contrario, en deficiencia de nitrógeno PipX se libera e interacciona con el factor de transcripción NtcA, induciendo la expresión de genes de respuesta a deficiencia de nitrógeno. De esta forma, una condición ambiental modula diferentes interacciones, dando lugar a una respuesta integrada (24).

Otros ejemplos podrían ser la interacción de las proteínas del fago T4 MotA, que se une al DNA, y AsiA, que recluta la RNA polimerasa (25); o DhaL-ADP y DhaK, que actúan respectivamente como coactivador y correpresor del factor transcripcional DhaR, según el ratio ATP/ADP celular (26). Además, la heterodimerización de factores transcripcionales es frecuente en eucariotas, modulando su actividad, especificidad de unión a DNA y/o reclutamiento de otras proteínas, permitiendo una regulación transcripcional más fina (27).

## 2.6. Interacciones entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7110

Las proteínas FurA, FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 actúan de forma independiente, pero se ha observado una interregulación entre ellas. FurA se une a los tres promotores *fur*, con mayor afinidad en presencia de metal. FurB también se une a los tres promotores, en menor medida en presencia del agente reductor DTT. FurC, sin embargo, no se une a ninguno de estos promotores (14), lo cual sugiere una interacción entre estas proteínas. Recientemente, experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) revelaron la existencia de una interacción *in vitro* entre FurC y FurA, así como entre FurC y FurB. Sin embargo, no se observó interacción entre FurA y FurB (28).

### 3. Objetivos

El impacto de los tres parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120 sobre su fisiología hace de ellos un atractivo objeto de estudio, con numerosos trabajos publicados, pero la posibilidad de que establezcan interacciones físicas y las implicaciones biológicas que esto podría tener no han sido analizadas en profundidad. Por ello, el propósito de este trabajo es avanzar en el estudio de estas interacciones, estableciéndose los siguientes objetivos:

1. Estudio de la interacción *in vivo* entre las proteínas FUR de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante ensayos de doble híbrido.
2. Análisis del impacto de determinados factores sobre la interacción *in vivo* de estas proteínas.
3. Determinación del efecto de la presencia de cloruro sódico en la interacción observada *in vitro* por calorimetría de titulación isotérmica.
4. Estudio del posible efecto de la interacción sobre la estructura de estas proteínas a través de medidas de dicroísmo circular.

### 4. Materiales y métodos

Los cultivos bacterianos se realizaron en esterilidad, lo que implica la esterilización en autoclave del material autoclavable, uso de material desechable estéril y filtración a 22 µm de disoluciones no autoclavables. Además, los cultivos se manipularon a la llama.

#### 4.1. Ensayo de doble híbrido

En los ensayos de doble híbrido se utilizó el kit *BACTH System* de *Euromedex* (29), basado en la fusión de proteínas de estudio al dominio T25 o T18 de la adenilato ciclase, enzima que cataliza la formación de AMP cíclico (cAMP). Si la proteína fusionada a T25 interacciona con aquella unida a T18, la cercanía de los dos dominios permite la síntesis de cAMP. Éste se une a CAP (*catabolite activator protein*), causando la expresión del gen *lac*, que codifica para la proteína β-galactosidasa (β-GAL). Esta expresión es detectable en placa por la hidrólisis de X-Gal al generar un producto de color azul, y en medio líquido con ONPG, dando lugar a un producto soluble de color amarillo.

##### 4.1.1. Cepas empleadas y cultivo

Las cepas empleadas derivan de *Escherichia coli* Δ<sub>cya</sub> BTH101, sin expresión propia de adenilato ciclase. Esta cepa había sido transformada con dos plásmidos de expresión de proteínas de fusión de las secuencias de las distintas proteínas Fur a la de los dominios T25 (plásmidos pKT25 y pKNT25) o T18 (pUT18 y pUT18c) bajo el control del promotor *plac*, inducible por IPTG. Para cada dominio se establecieron proteínas de fusión en N-terminal (pKNT25 o pUT18) y en C-terminal (pKT25 / pUT18c).

Cada cepa presenta dos plásmidos diferentes, para todas las combinaciones de pares de proteínas de fusión: un plásmido con una proteína fusionada a T25 en N- o C-terminal y otro con una proteína diferente fusionada a T18. Se obtienen así ocho cepas por pareja: de AC1 a AC8 y de BC1 a BC8. Como control negativo (C-) se empleó una cepa transformada con plásmidos expresando T25 y T18 sin fusionar a ninguna proteína,

mientras que el control positivo (C+) expresa estos dominios fusionados a los de la cremallera de leucina de GCN4. Las distintas cepas disponibles, proporcionadas por el grupo de Regulación Génica y fisiología de cianobacterias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, pueden consultarse en el Anexo Tabla 9.1.

Las cepas (almacenadas a -80°C) se inocularon en placas de medio estéril LB-agar 1,5% suplementadas con los antibióticos kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. Se incluyó IPTG en concentración final 0,5 mM como inductor de expresión y X-Gal a 20 µg/mL como indicador de actividad β-GAL. Las placas se incubaron a 30°C toda la noche (O/N), tras lo cual se prepararon los pre-inóculos en 3 mL de medio de cultivo estéril con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. El medio empleado fue medio completo LB o medio mínimo M9 suplementado con glucosa 1 M, o variaciones de este último tal y como se describe en el apartado de Resultados. La composición del medio LB es de peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 2 g/L en agua destilada, mientras que el medio M9 se compone de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 15,17 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 3 g/L, NaCl 0,5 g/L y NH<sub>4</sub>Cl 1 g/L suplementado con 2,5 mL/L de *goodies*, de composición 25% v/v MgSO<sub>4</sub> 1M, 25% v/v FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 10 g/L y 50% v/v de stock de sales. El stock de sales se prepara con MgO 10,75 g/L, CaCO<sub>3</sub> 2 g/L, CoCl<sub>2</sub> 0,13 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 4,5 g/L, MnSO<sub>4</sub> · 1 H<sub>2</sub>O 0,92 g/L, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O 0,25 g/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 1,48 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 7·H<sub>2</sub>O 0,06 g/L y HCl concentrado 51,3 mL/L en agua destilada.

Los pre-inóculos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm O/N. Se midió su DO<sub>600nm</sub> en un espectrofotómetro *SPECORD PLUS Analytik Jena* y se tomó el volumen necesario para inocular a DO<sub>600nm</sub> = 0,05 en 20 mL (condiciones aeróbicas) o 40 mL (semianaerobiosis). Los inóculos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL con medio estéril, kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. Se incubaron a 30°C y 150 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> = 0,1. Entonces se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 0,5 mM. Tras 24 h a 30°C y 150 rpm, se determinó la actividad β-GAL.

#### 4.1.2. Ensayo de expresión de β-galactosidasa

Este paso no requiere esterilidad. Se prepararon mezclas en tubo de ensayo con 25 µL de cloroformo, 25 µL de SDS 0,1% y 1 mL de buffer Z, compuesto de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 0,06 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,04 M, KCl 0,01 M, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,001 M y β-mercaptopropano 0,05 M a pH 7. A cada mezcla se añadieron 25 o 100 µL (a optimizar según la fuerza de la interacción) del cultivo correspondiente. Como control negativo se empleó una mezcla de los mismos reactivos sin inóculo. Tras mezclar en vortex para facilitar el lisado celular y esperar 2 min, se añadieron 200 µL de ONPG 4 mg/mL. Se anotó el tiempo de viraje a amarillo, parando la reacción con 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M antes de medir la absorbancia de cada muestra a 420 nm y 550 nm en un espectrofotómetro *SPECORD PLUS Analytik Jena*. La interacción se evaluó en unidades Miller mediante la siguiente fórmula:

$$1000 \cdot \frac{Abs_{420nm} - (1,75 \cdot Abs_{550nm})}{T(min) \cdot V_{cultivo}(mL) \cdot Abs_{600nm}}$$

#### 4.1.3. Análisis estadístico

Las medidas de actividad β-GAL se realizaron por duplicado para cada réplica biológica, por lo que para comparar los valores de unidades Miller de cada muestra se aplicó un test paramétrico T-Test no pareado a través de la herramienta estadística del programa *GraphPad Prism 7*. Se estableció el umbral de significación en un P-valor ≤ 0,05.

## 4.2. Purificación de FurB de *Anabaena* sp. PCC7120

### 4.2.1. Transformación de células *E. coli* BL21-Gold con el plásmido pET-28a-FurB por choque térmico

La obtención de biomasa comenzó por la transformación de *E. coli* BL21-Gold DE3 termocompetentes con un vector pET-28a(+) de Novagen contenido la secuencia de la proteína FurB con cola de histidinas N-terminal. Las células, almacenadas a -80°C, se descongelaron 15 min en hielo antes de añadirles 1 µL de suspensión con el plásmido. Se incubaron 30 min en hielo, tras lo cual se aplicó el choque térmico a 42°C durante 1 min. Tras incubar en hielo 2 min, se añadieron 800 µL de medio LB estéril y se incubaron durante 1,5 h a 150 rpm y a 37°C. Pasado este tiempo, se sembraron en placas de LB-Agar 1,5% con kanamicina 50 µg/mL, que se incubaron O/N a 37°C.

### 4.2.2. Ensayo de sobreexpresión

Para seleccionar la colonia de células transformadas de mayor sobreexpresión se seleccionaron cuatro colonias y se estriaron en placas de LB-Agar 1,5% con kanamicina 50 µg/mL, inoculando paralelamente con la misma colonia en tubos Falcon con 10 mL de LB estéril con kanamicina 50 µg/mL. Los cultivos en líquido se incubaron O/N a 37°C a 200 rpm, y se refrescaron por dilución 1:100 en LB, incubándose a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600\text{nm}} = 0,5$ . Entonces se dividió el cultivo a dos tubos Falcon estériles. En uno de ellos se indujo la sobreexpresión con IPTG 1 mM, mientras que el otro se mantuvo como control sin inducir. Ambos se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 3,5 horas antes de comprobar la expresión por SDS-PAGE.

### 4.2.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se centrifugó 1 mL de cada muestra a 14.000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga *Eppendorf 5427R*, descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 40 µL de agua Milli-Q y 10 µL de buffer de carga con β-mercaptoetanol 5x. Se hirvieron las muestras 5 min a 97°C y, tras centrifugar 5 min a 14.000 rpm, se aplicaron 10 µL a un gel de SDS-PAGE 17% (composición según Anexo tabla 9.2.). Como marcador de peso molecular se empleó *NZY colour protein marker II*. La electroforesis se corrió 45 minutos a 35 mA por gel. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie y se destiñeron con la solución de destinción (composiciones según Anexo Tabla 9.3. y Anexo Tabla 9.4).

### 4.2.4. Obtención de biomasa de *E. coli* BL21-Gold con el plásmido pET28a-FurB

La colonia de mayor sobreexpresión se inoculó en 10 mL de LB estéril con kanamicina 50 µg/mL. Tras incubar O/N a 37°C y 200 rpm, se inocularon Erlenmeyers con 1 L de LB estéril con kanamicina 50 µg/mL. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 160 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0,5$ . En este momento se indujo la sobreexpresión con IPTG 1 M, incubándose O/N a 15°C y 160 rpm en una incubadora *Excella E25 Incubator Shaker Series*. La biomasa se recogió y centrifugó a 10 min 8.000 rpm y 4°C en una centrífuga *Beckam Coulter Avanti Centrifuge J-25*. La biomasa centrifugada se traspasó el pellet a un tubo Falcon de 50 mL y se pesó antes de conservar a -20°C hasta su utilización.

### 4.2.5. Obtención del extracto crudo por sonicación y purificación por IMAC

Se resuspendieron 8 g de biomasa descongelada en 20 mL de buffer de purificación, cuya composición es GndCl 2 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y Tris 10 mM a pH 8, con 1mM de PMSF como inhibidor de proteasas, manteniéndola siempre en hielo. La biomasa se

sometió a 10 ciclos de 45 segundos de sonicación con amplitud 80% y ciclo 0,5 separados por 30 segundos de reposo, en un sonicador *UP 200S Dr. Hielescher*. La muestra sonicada se centrifugó 30 min a 12.000 rpm y 4°C en una centrífuga *Allegra X 30R*. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,22 µm antes de purificar la proteína.

FurB se había clonado en pET28a(+) de forma que se expresara con una cola de histidinas, por lo que su purificación se realizó por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) con una matriz *Chelating Sepharose Fast Flow* cargada con cinc, con el cual las histidinas pueden establecer complejos. Se empaquetaron 10 mL de resina, que se lavó con 10 volúmenes de agua Milli-Q a 3 mL/min. La columna se cargó con 3 volúmenes de ZnSO<sub>4</sub> 0,25 M, se lavó con 5 volúmenes de agua Milli-Q para eliminar el exceso de metal y con otros 5 volúmenes de buffer de purificación para equilibrar la columna. El extracto crudo se aplicó a la columna con un flujo de 1 mL/min. Una vez cargado, se aplicó el buffer de lavado (buffer de purificación con 35 mM de glicina) para eliminar proteínas retenidas de forma no específica, hasta alcanzar una DO<sub>280nm</sub> ≤ 0,1. La proteína de interés se eluyó con un gradiente creciente de imidazol 0-1 M. Las fracciones eluidas se recogieron en alícuotas de aproximadamente 1 mL.

#### 4.2.6. Análisis y cuantificación de FurB de *Anabaena* sp. PCC7120 purificada

Las alícuotas con mayor concentración de proteína se identificaron por SDS-PAGE. Ya que el GndCl interfiere con este ensayo, primero se precipitó la proteína con ácido tricloroacético (TCA). Se mezclaron 15 µL de alícuotas representativas con 85 µL agua Milli-Q y 100 µL de TCA 10%. Se incubaron en hielo 15 min y se centrifugaron 10 min a 12.700 rpm y 4°C en una centrífuga *Allegra X 30R*, descartando el sobrenadante y añadiendo 200 µL de acetona fría. Se centrifugó de nuevo a 12.700 rpm y 4°C durante 10 min, descartando el sobrenadante y dejando secar el precipitado a temperatura ambiente durante 15 min para eliminar los restos de acetona. El precipitado se resuspendió en 20 µL de agua Milli-Q y 5 µL de buffer de carga 5x. Tras hervir las muestras 5 min a 97°C e incubar 1 min en hielo, se centrifugaron 5 min a 12.700 rpm en una microcentrífuga *Eppendorf 5427R*. Se cargaron 20 µL de sobrenadante a un gel de electroforesis SDS-PAGE, que se corrió a 35 mA unos 35 min. Tras teñir con Azul de Coomasie y destear con la solución de destinción (Anexo Tablas 9.3. y 9.4.), se identificaron y combinaron las fracciones con mayor cantidad de proteína.

Las fracciones se dializaron en cámara fría a buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5, más adecuado para su conservación. Su concentración se calculó midiendo su absorbancia a 276 nm, su máximo, y aplicando la ley de Beer-Lambert:  $Abs_{276\text{ nm}} = \varepsilon_{276\text{ nm}} \cdot l \cdot c$ , donde  $\varepsilon_{276\text{ nm}}$  es el coeficiente de extinción a 276 nm,  $l$  es la longitud de paso de la cubeta y  $c$  es la concentración proteica. Como blanco se empleó el buffer de dialisis.

### 4.3. Calorimetría de titulación isotérmica

En los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) la proteína elegida para la jeringa se aplicó a una concentración aproximadamente 10 veces mayor que la proteína de la celda, sobre la cual se titula. Cada ensayo requiere 400 µL de proteína para la celda, 150 µL de proteína para la jeringa y 400 µL de buffer para los lavados, dispensándose cada solución en un pocillo diferente de la misma placa. Las proteínas empleadas en ensayos ITC se dializaron frente al mismo buffer, acético-acetato 10 mM pH 5,5, ya que de otra forma la entalpía de disolución derivada de la mezcla de sus componentes sería significativa y podría enmascarar los cambios debidos a la

interacción entre las proteínas de estudio. El programa empleado para el ensayo fue el *Plates Precise Syringe Clean* con temperatura de ensayo 25°C, en un equipo *MicroCal Auto-iTC200* de *Malvern Panalytical*. Cada solución se desgaseó independientemente con un equipo *ThermoVac* a 10°C durante 2 min, previamente a su análisis por ITC.

#### 4.4. Dicroísmo circular

Para los ensayos de dicroísmo circular se empleó un equipo *Chirascan* de *Applied Photophysics* y el programa *ProData Viewer*. Las medidas se tomaron entre 190 y 260 nm con un cambio de 0,5 nm por paso con un tiempo por punto de 8 segundos. Para cada muestra se añadieron 200 µL de la disolución proteica correspondiente a una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz, con una concentración total de proteína de 10 µM en buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5.

### 5. Resultados

#### 5.1. Estudio de las interacciones entre los parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120 por ensayos de doble híbrido

El ensayo de doble híbrido se aplicó al estudio de la interacción *in vivo* de FurC con FurA y FurB. Las distintas cepas fueron crecidas en medio LB, medio mínimo con distinta composición en metales y en condiciones de semianerobiosis. La interacción fue determinada cuantitativamente a través de medidas de actividad β-GAL.

##### 5.1.1. Estudio de la interacción FurC-FurA por doble híbrido

En primer lugar, se evaluó la interacción entre FurC y FurA de *Anabaena* sp. PCC7120.

###### 5.1.1.1. Estudio de la interacción en medio LB

El estudio de la interacción entre FurC y FurA comenzó con la medida de la actividad β-GAL de las cepas AC1-8 cultivadas en LB. Estas cepas contienen por pares todas las combinaciones de plásmidos que codifican para proteínas de fusión de FurC y FurA al N- o C-terminal de los dominios T25 o T18 de la adenilato ciclase, según se ha explicado en el apartado 4.1. de Materiales y métodos. Se realizaron dos réplicas técnicas por cultivo. La Figura 5.1. recoge los resultados obtenidos. Los distintos niveles de significación mostrados en esta figura y las siguientes se definieron, de mayor a menor significación, a P-valor ≤ 0,0001 (representado como \*\*\*\*), P-valor ≤ 0,001 (\*\*), P-valor ≤ 0,01 (\*\*) y P-valor ≤ 0,05 (\*). P-valores superiores a 0,05 se consideraron no significativos (representados como ns).

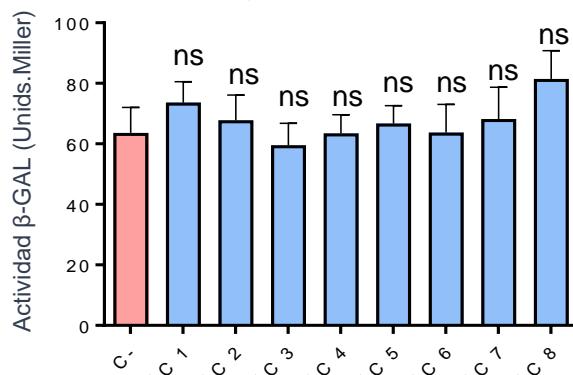


Figura 5.1. Actividad β-GAL detectada para las cepas AC1-8 en medio LB. Las relaciones de significación situadas encima de las barras representan la comparación al control negativo (C-).

Como se observa en la figura 5.1., no se detectó actividad  $\beta$ -GAL para ninguna de las cepas AC respecto al control negativo, lo cual implicaría que no se observa interacción entre FurA y FurC *in vivo* a través del ensayo de doble híbrido en LB, independientemente del tipo de fusión (a N- o C-terminal, para ambas proteínas). En experimentos posteriores se trató de determinar condiciones que permitieran observar la interacción identificada *in vitro* que no se pudo observar en este primer ensayo.

#### 5.1.1.2. Efecto de la aireación en la interacción en medio LB

Dado que FurA es una proteína sensible a cambios redox y FurC parece ser el homólogo a PerR, se planteó que pudieran no encontrarse en la conformación redox adecuada para interaccionar. Para ello se trató de alterar su estado redox modificando la aireación. Esto se realizó empleando un volumen de 20 mL (aerobiosis) o 40 mL (semianerobiosis) de LB en matraces idénticos e iguales condiciones de agitación. Dado que ninguna de las cepas empleadas en el experimento anterior mostró actividad  $\beta$ -GAL, se seleccionaron las cepas AC1 y AC2 como representativas. Para cada cepa y condición se realizaron dos réplicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada una, obteniéndose los resultados indicados en la Figura 5.2.. Se valoró la actividad  $\beta$ -GAL por comparación al control negativo correspondiente, representando la relación de significación (\*\*\*\*, \*\*\*, \*\*, \* o ns) sobre la barra. Por otro lado, el efecto de la aireación se valoró por comparación de la actividad  $\beta$ -GAL generada por los cultivos en aerobiosis (OX) con los cultivos en semianerobiosis (SA), de forma independiente para cada cepa, y se representó por medio de corchetes acompañando a la relación de significación.

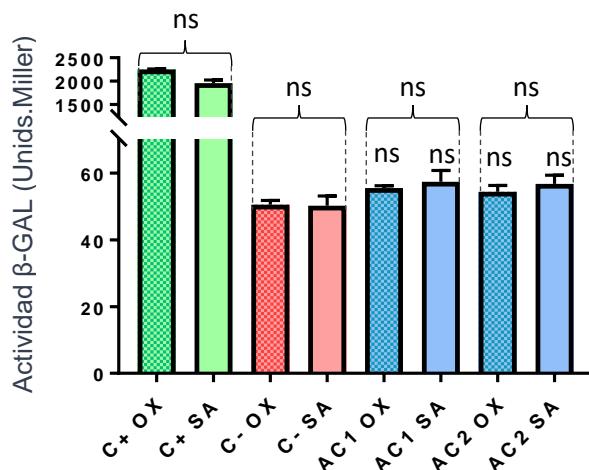


Figura 5.2. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas AC1 y AC2 cultivadas en LB en condiciones de aerobiosis (OX) o semianerobiosis (SA), así como los controles positivos (C+) y negativos (C-). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas sobre las barras comparan con el control negativo correspondiente.

Los resultados obtenidos indican que, para un P-valor umbral de 0,05, no se detecta actividad  $\beta$ -GAL significativa en ninguna de las cepas ensayadas en comparación con el control negativo, y no hay diferencias en la actividad detectada según el nivel de aireación para la misma cepa. Esto sugiere que el estado redox derivado de la presión de oxígeno no tiene un efecto sobre la interacción entre las proteínas FurC y FurA.

#### 5.1.1.3. Estudio de la interacción en medio mínimo M9

El medio LB es un medio cuya composición exacta es desconocida, por lo que no permite la eliminación de componentes específicos. En cambio, los componentes del

medio mínimo M9 están definidos, y se puede preparar en ausencia de cualquiera de ellos. Previamente a los ensayos de modificación de la disponibilidad de metales se evaluó la actividad  $\beta$ -GAL generada tras el cultivo en LB y en M9 de forma paralela, a modo de control para garantizar que cualquier diferencia en la señal respecto a los experimentos en LB que se pudiera observar respondiera específicamente a la eliminación del metal correspondiente. La actividad  $\beta$ -GAL generada tras crecimiento en medio LB o M9 se estudió para las cepas AC1 y AC2, de nuevo con dos réplicas biológicas por cepa y dos réplicas técnicas por réplica biológica. La Figura 5.3 representaba los resultados obtenidos en estas condiciones.

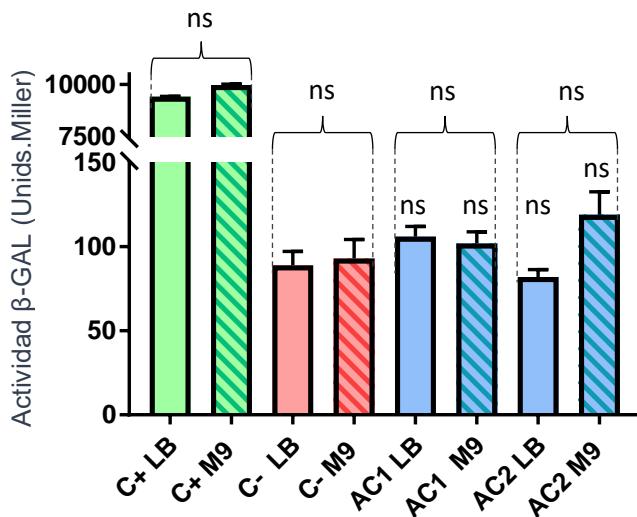


Figura 5.3. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas AC1 y AC2 cultivadas en medio LB y M9, así como los controles positivos (C<sup>+</sup>) y negativos (C<sup>-</sup>). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.

La actividad  $\beta$ -GAL detectada en este ensayo para cada una de las cepas no resultó significativa en ninguno de los casos al comparar con sus correspondientes controles negativos, de forma equivalente en ambos medios, lo que indica que en las condiciones del ensayo FurA y FurC no interaccionan.

#### 5.1.1.4. Efecto de la disponibilidad de cinc en la interacción en M9

Las proteínas Fur actúan generalmente en forma homodimérica, de forma que para el establecimiento de interacciones heterodiméricas podría ser necesaria su disociación. Estudios previos apuntan a que el cinc podría afectar a la forma oligomérica de las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120 (28), pudiendo estar favoreciendo la disociación. En consecuencia, se decidió analizar el efecto de la disponibilidad de este metal sobre el establecimiento de la interacción entre FurA y FurC. Para ello, se eliminó el  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  del stock de sales y se cultivaron las cepas AC1-4 en paralelo en M9 o M9 sin cinc.

En este caso se empleó el doble de cepas, cuatro en vez de dos, a fin de realizar un muestreo más amplio en cuanto a las posibles consecuencias del sitio de fusión de la proteína. Los resultados obtenidos quedan representados en la Figura 5.4.

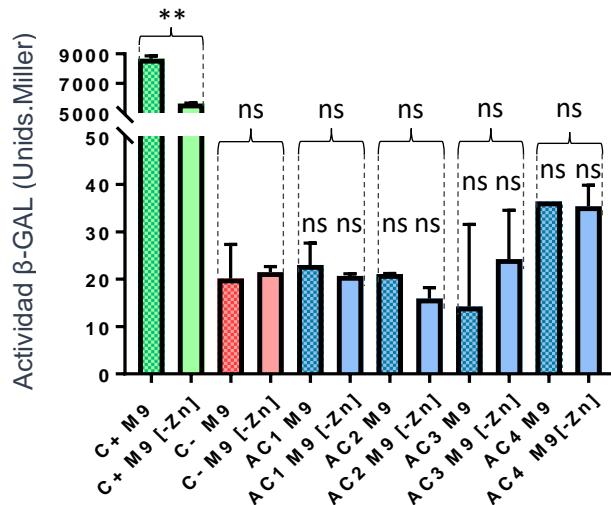


Figura 5.4. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas AC1-4 cultivadas en medio mínimo con (M9) o sin cinc (M9[-Zn]), así como los controles positivos (C+) y negativos (C-). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.

Como se observa en la figura 5.4., en ningún caso se detectó actividad  $\beta$ -GAL significativa ( $P$ -valor  $\leq 0,05$ ), lo que sugiere que la disponibilidad de cinc de forma aislada no tiene un efecto sobre la interacción, ya que su eliminación del medio no es suficiente para activar la expresión de  $\beta$ -GAL. Si el cinc determinara la forma oligomérica de estos parálogos FUR (28), los resultados parecen indicar que ésta no tendría un papel determinante en la interacción FurC-FurA,

#### 5.1.1.5. Efecto de la disponibilidad de manganeso en la interacción en M9

Dado que manganeso provoca la insensibilización de PerR a MCO y se considera que FurC pueda ser un homólogo PerR, se evaluó su efecto sobre la interacción eliminando el  $MnSO_4 \cdot 1 H_2O$  del stock de sales. Al eliminar el manganeso del medio, era previsible que FurC adquiriese su forma oxidada mediante MCO. En este caso se emplearon de nuevo cuatro cepas, de AC1 a AC4. La Figura 5.5. representa la actividad  $\beta$ -GAL detectada para estas cepas en M9 en presencia o ausencia de manganeso.

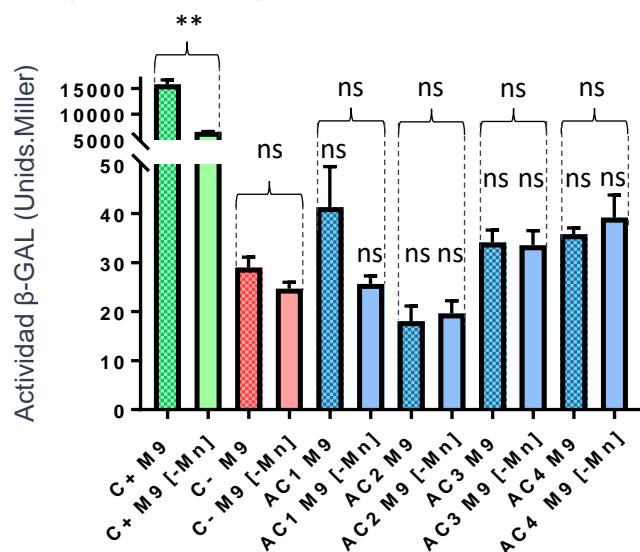


Figura 5.5. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas AC1-4 cultivadas en medio mínimo con (M9) o sin cinc (M9[-Zn]), así como los controles positivos (C+) y negativos (C-). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.

Estos resultados parecen indicar que la disponibilidad de manganeso no es un factor determinante de la interacción entre FurA y FurC, pues no se observa actividad  $\beta$ -GAL significativa ni en su presencia ni en su ausencia.

Considerando los datos recogidos en el apartado 5.1.1. de manera global, se podría decir que pese a que la interacción entre FurA y FurC había sido observada *in vitro* por ITC (28), los resultados parecen indicar que no tiene lugar *in vivo* en las condiciones testadas. En la actualidad desconocemos la forma en la que se encuentran las proteínas FurA y FurC en el ensayo de doble híbrido y por qué no se observa interacción en ninguna de las condiciones probadas. Por ello se plantea en el futuro analizar más condiciones, o combinaciones de las ensayadas, a fin de determinar si la interacción FurC-FurA realmente se da *in vivo*.

### 5.1.2. Estudio de la interacción FurC-FurB por doble híbrido

En segundo lugar, se evaluó la interacción entre las proteínas FurC y FurB de *Anabaena* sp. PCC7120.

#### 5.1.2.1. Estudio de la interacción en medio LB

De forma similar a lo descrito para AC, se evaluó en primer lugar la actividad  $\beta$ -GAL sobre las cepas BC1-8, equivalentes a AC1-8 pero expresando proteínas de fusión a FurC y FurB. Estas cepas fueron cultivadas en medio LB, con dos réplicas técnicas por cepa, a fin de determinar si se observaba interacción para alguna de ellas. La Figura 5.6. representa los resultados obtenidos en estas condiciones.

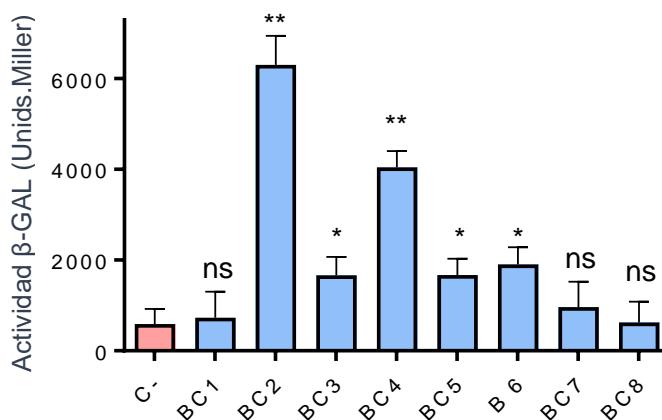
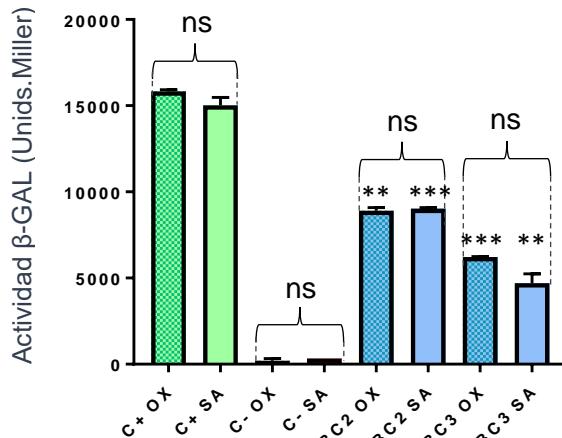


Figura 5.6. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas BC1-8 en medio LB. Las relaciones de significación situadas encima de las barras representan la comparación al control negativo (C-).

En este caso, los resultados indicaron que, efectivamente, se observaba actividad  $\beta$ -GAL clara en varias de las cepas BC. Esto sugiere que las proteínas FurB y FurC son capaces de interaccionar en medio LB de forma detectable, con mayor intensidad para las cepas BC2 y BC4. En vista de los resultados, se decidió no emplear las cepas BC1, BC7 y BC8 para los posteriores ensayos.

#### 5.1.2.2. Efecto de la aireación en la interacción en medio LB

Vista la interacción aparente en medio LB para FurB y FurC, en este caso el estudio del efecto la aireación tenía el objetivo de determinar si cambios en el estado redox podrían condicionar esta interacción. Para ello se emplearon las cepas BC2-3 como representativas, cultivadas en LB en anaerobiosis o aerobiosis.

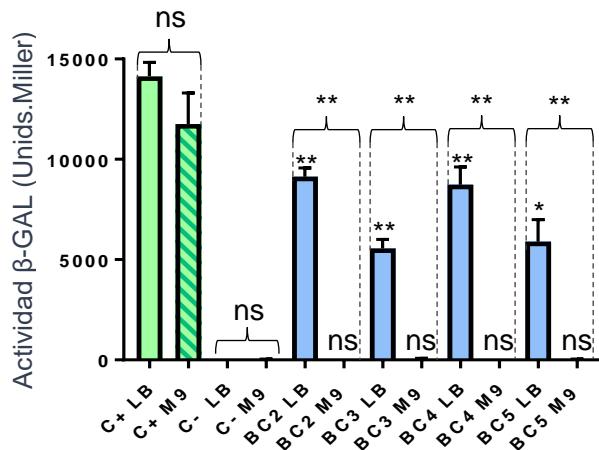


**Figura 5.7. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas BC2 y BC3 en semianerobiosis (SA) y aerobiosis (OX), así como los controles positivos ( $C^+$ ) y negativos ( $C^-$ ). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.**

Según estos resultados, la actividad  $\beta$ -GAL se mantiene independientemente del nivel de aireación, obteniéndose resultados positivos en todos los casos ensayados sin diferencias significativas entre aerobiosis y semianerobiosis.

#### 5.1.2.3. Estudio de la interacción en medio mínimo M9

Al igual que con AC, se realizó un ensayo en M9 como control antes de proceder a la eliminación de metales. Las cepas empleadas fueron BC2-5, a fin de poder observar potenciales diferencias según el sitio de fusión. Se realizaron dos réplicas técnicas por cepa y condición, obteniendo los resultados representados en la Figura 5.8..



**Figura 5.8. Actividad  $\beta$ -GAL de las cepas BC2-5 cultivadas en LB o M9, así como los controles positivos ( $C^+$ ) y negativos ( $C^-$ ). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.**

Los resultados observados indican una ausencia total de actividad  $\beta$ -GAL en medio M9, obteniéndose valores comparables a los del control negativo, mientras que en LB la actividad se mantiene. Esto sugiere que un elemento diferencial entre los dos medios provoca la interrupción de la interacción en M9. Podría deberse a la presencia de algún activador presente en el medio LB y ausente en M9, un compuesto que desestabiliza la interacción presente en mayor medida en M9 o diferencias en el contenido en las fuentes de carbono en ambos medios. Sin embargo, no sería posible con estos resultados

proponer ningún compuesto específico como el responsable de esta diferencia de comportamiento, debido a la composición no definida del medio LB.

#### 5.1.1.4. Efecto de la disponibilidad de cinc en la interacción en medio M9

Dado que el posible efecto del cinc sobre la oligomerización podría afectar tanto a FurB como a FurC, se planteó que su estado oligomérico fuera diferente en función de la disponibilidad de cinc y esto tuviera relación con la ausencia de interacción en M9. Por tanto, se buscó evaluar su efecto realizando el ensayo sobre las cepas BC2-5 cultivadas en presencia y ausencia de cinc, realizando dos réplicas técnicas por cepa y condición. Los resultados de este ensayo quedan representados en la Figura 5.9..

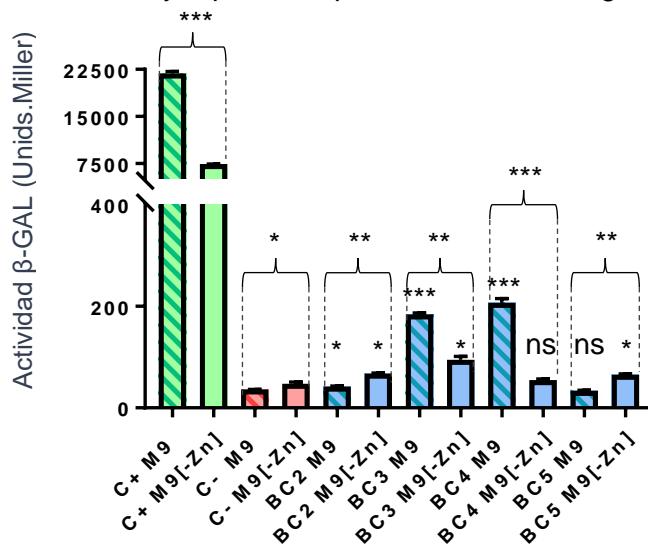


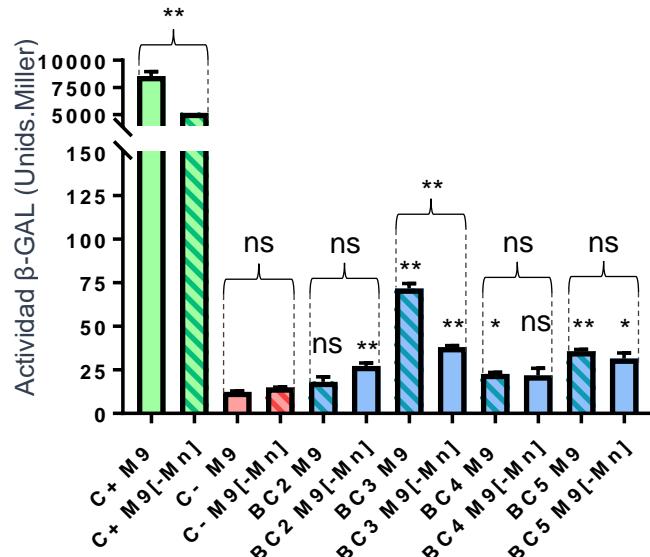
Figura 5.9. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas BC2-5 cultivadas en medio mínimo con (M9) o sin cinc (M9[-Zn]), así como los controles positivos (C+) y negativos (C-). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.

En este ensayo se observó actividad  $\beta$ -GAL significativa en todas las condiciones y cepas salvo para BC4 en ausencia de cinc y BC5 en presencia de cinc. Sin embargo, la señal es baja: la actividad  $\beta$ -GAL en LB alcanzaba hasta un 66% del control positivo (Figura 5.8.), mientras que aquí no llega al 1%. Como en el ensayo anterior se emplearon 25  $\mu$ L de inóculo y en este caso se emplearon 100  $\mu$ L, es posible que la sensibilidad del anterior fuera insuficiente para detectar la interacción FurC-FurB, que podría no estar siendo impedida por completo, pero sí en gran medida.

Las diferencias en actividad entre las cepas cultivadas en presencia o ausencia de cinc no implican necesariamente un efecto específico del cinc, ya que ambos controles se ven afectados por la deficiencia de cinc, especialmente el positivo. Este comportamiento se observó también en los ensayos con las cepas AC (Figura 5.4.), por lo que una menor actividad en ausencia de cinc parece ser un fenómeno propio del ensayo más que una consecuencia de la alteración de la interacción entre las proteínas.

#### 5.1.2.5. Efecto de la disponibilidad de manganeso en la interacción en M9

Finamente, se evaluó la posible implicación de la disponibilidad de manganeso en la interacción entre FurC y FurB, cultivando las cepas BC2-5 en medio M9 en presencia o ausencia de este metal, empleando 25  $\mu$ L de inóculo. Los resultados quedan recogidos en la Figura 5.10..



**Figura 5.10. Actividad  $\beta$ -GAL detectada para las cepas BC2-5 cultivadas en medio mínimo con (M9) o sin manganeso (M9[-Mn]), así como los controles positivos ( $C^+$ ) y negativos ( $C^-$ ). Las relaciones de significación acompañadas de corchetes comparan actividad  $\beta$ -GAL en distintas condiciones; las situadas encima de las barras comparan con el control negativo correspondiente.**

Según los resultados obtenidos, no parece que el manganeso tenga un efecto determinante sobre la interacción entre FurB y FurC, pues la única cepa para la que hay una diferencia significativa en actividad  $\beta$ -GAL entre cultivo con o sin manganeso (Figura 5.10. – BC3) lo hace en similar medida que el control positivo. Sí se observa de nuevo que podrían estar interaccionando en M9, aunque de forma muy débil.

Tomando todos los resultados del punto 5.1.2. en consideración, se concluye que la interacción entre FurB y FurC se observa *in vivo* a través del ensayo de doble híbrido en medio rico LB en condiciones de aerobiosis y semianaerobiosis, pero no en M9 independientemente de la disponibilidad de cinc o manganeso en las condiciones ensayadas. Sin embargo, ya que estas condiciones parecen afectar a los controles positivos en el caso de la disponibilidad de metales, sería conveniente comprobarlo con técnicas alternativas. Además, los resultados indican que algún elemento presente en M9, pero no en LB, o en concentraciones diferentes, podría estar impidiendo la interacción entre estas dos proteínas.

## 5.2. Estudio del efecto del NaCl en la interacción entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120

Las interacciones electrostáticas entre proteínas aportan estabilidad mediante la compensación de cargas opuestas que pueden no estar suficientemente estabilizadas por el agua del medio. La presencia de cloruro sódico (NaCl) interfiere con estas interacciones al disociarse a iones  $Na^+$  y  $Cl^-$ , que pueden establecer interacciones electrostáticas con las proteínas e impedir que lo hagan entre sí (30). A fin de valorar su posible implicación en la interacción entre FurC y FurB o FurA se realizaron experimentos de ITC, ya que éstos habían permitido anteriormente detectar interacción entre estas proteínas, empleando el mismo buffer suplementado con 150 mM de NaCl en este caso.

### 5.2.1. Purificación y cuantificación de FurB

En el laboratorio no se disponía de FurB para realizar los ensayos, por lo que fue necesario purificarla. En primer lugar, se llevó a cabo la sobreexpresión en sistema heterólogo de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 4.2. de Materiales y métodos. El ensayo de sobreexpresión por SDS-PAGE permitió elegir la cepa óptima para la sobreexpresión entre las evaluadas (Anexos - Figura 9.1.). De los 15,65 g de biomasa obtenidos, se emplearon 8 g para la purificación por IMAC-Zn<sup>2+</sup>.

En vista del análisis de alícuotas representativas por SDS-PAGE (Anexos - Figura 9.2) se decidió combinar las alícuotas 20-22 y 23-26 en fracciones independientes, que fueron dializadas a buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5. La concentración obtenida se calculó aplicando la ley de Beer-Lambert con el coeficiente de extinción molar de FurB ( $\epsilon_{276\text{nm}} = 5720 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), obteniéndose valores de 79  $\mu\text{M}$  para la fracción más diluida y 156  $\mu\text{M}$  para la más concentrada.

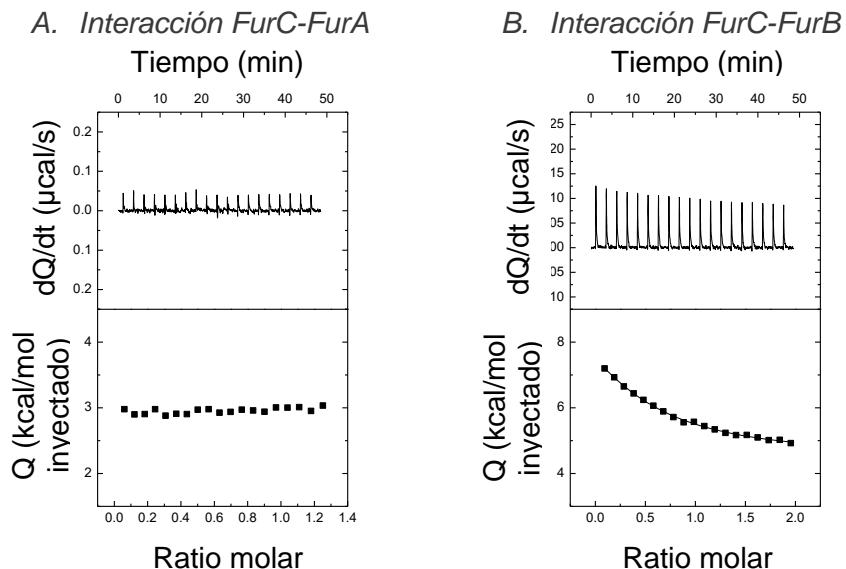
### 5.2.2. Preparación de las muestras de FurA y FurC

Para los ensayos de ITC se disponía de FurB recién purificada, así como FurA y FurC proporcionadas por Cristina Sarasa Buisán que fueron dializadas frente a buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5. Se cuantificaron de forma análoga a FurB, tomando una medida de absorbancia y aplicando la ley de Beer-Lambert con sus respectivos coeficientes de extinción a 276 nm, la longitud de onda de máxima absorción para estas tres proteínas:  $\epsilon_{276\text{nm}}(\text{FurA}) = 13.760 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{276\text{nm}}(\text{FurC}) = 13.490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . De esta forma se obtuvo que FurC se encontraba a 11  $\mu\text{M}$ , mientras que FurA se encontraba a 54  $\mu\text{M}$ . Esta última se concentró un centrífugado Amicon Ultra-15 de 3 kD de Millipore, alcanzando una concentración final de 70  $\mu\text{M}$ .

### 5.2.3. Análisis de la interacción FurC-FurA y FurC-FurB en presencia de NaCl por ITC

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica calorimétrica cuantitativa que permite estudiar interacciones moleculares en disolución. Aunque se suele utilizar para valorar la interacción de pequeños ligandos a proteínas, también se puede aplicar a las interacciones entre proteínas. Conforme se titula una proteína sobre otra, se detecta el calor emitido o absorbido por comparación a la energía necesaria para mantener la temperatura de la celda de referencia. Esto permite determinar los parámetros termodinámicos que definen la interacción entre dos proteínas (31).

A fin de estudiar el efecto de la presencia de NaCl sobre la interacción entre FurC y FurA o FurB, se realizaron ensayos ITC en buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5 con 150 mM de NaCl. Para el análisis de la interacción entre FurA y FurC se empleó FurC para la celda y FurA para la jeringa, a una concentración final de 10,6  $\mu\text{M}$  y 64  $\mu\text{M}$  respectivamente. En el caso de FurB y FurC, la que se empleó en jeringa fue FurB, a concentración final de 100  $\mu\text{M}$  e igualmente en presencia de NaCl 150 mM. Al encontrarse las proteínas en el mismo buffer, consideramos que el calor de dilución es despreciable. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Figura 5.13..



**Figura 5.13. Resultados de los ensayos ITC en buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5 150 mM NaCl a 25°C para la titulación de FurA sobre FurC (A) o FurB sobre FurC (B).** Los paneles superiores indican la señal tras cada inyección de proteína a la celda, mientras que los inferiores representan la integración del calor en el tiempo en función de la ratio molar de proteína inyectada/proteína en la celda.

El análisis de los datos obtenidos permitió determinar los diferentes parámetros termodinámicos que definen la interacción detectada, recogidos en la Tabla 5.1..

	$K (M^{-1})$	$K_d (\mu M)$	$\Delta H (kcal/mol)$	$n$
<b>FurC-FurA</b>	No se detectó interacción			
<b>FurC-FurB</b>	$1.1 \cdot 10^5$	9.5	8.9	0.5

**Tabla 5.1. Parámetros termodinámicos de la interacción de FurC con FurA o FurB.** K: constante de unión.  $K_d$ : constante de disociación.  $\Delta H$ : entalpía de unión. n: estequiométría de unión.

Los datos mostrados en la figura 5.13. indican que no se detecta interacción entre FurA y FurC en las condiciones del ensayo, pero sí para FurB y FurC, con una constante de disociación de 9,5  $\mu M$  (Tabla 5.1.). En anteriores ensayos de ITC (28), en los cuales no se añadía NaCl, se obtuvieron constantes de disociación de 0,97 y 0,45  $\mu M$ , respectivamente, para FurC-FurA y FurC-FurB. Constantes de disociación hasta tres veces superiores no se consideran significativamente diferentes, pero en el caso de FurC-FurB se observa un valor 21 veces superior, por lo que se puede considerar que la interacción detectada es inferior en presencia de NaCl 150 mM. De esta forma, los ensayos realizados sugieren que el NaCl tiene un efecto negativo sobre la interacción de FurC con FurA y FurB, reduciendo su afinidad. No se podría afirmar que el NaCl impide la interacción de FurC con FurA en mayor medida que para FurB, ya que desde un principio la fuerza de esta interacción era menor. Por tanto, una reducción equivalente de la afinidad podría implicar que la interacción entre FurA y FurC bajara a niveles no detectables, mientras que con FurB todavía se podría detectar.

### 5.3. Estudio de la alteración estructural causada por la interacción entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120

El dicroísmo circular (CD) es la propiedad de ciertas sustancias de absorber la luz de distinta forma según haya sido polarizada circularmente en un sentido o el contrario. Ya que el dicroísmo circular de una proteína se altera cuando se modifica su estructura, es

una técnica útil para el estudio de las alteraciones estructurales que pueden tener lugar a consecuencia de la interacción entre dos proteínas (32).

La medida del dicroísmo circular se realizó para las tres proteínas individuales a 10  $\mu\text{M}$ , para una mezcla de FurA 5  $\mu\text{M}$  y FurC  $\mu\text{M}$  y para una mezcla de FurB 5  $\mu\text{M}$  y FurC 5  $\mu\text{M}$ . Como control, se analizó también una disolución con FurC 5  $\mu\text{M}$  y BSA 5  $\mu\text{M}$ . Para todas las medidas se empleó como blanco buffer acético-acetato 10 mM pH 5,5 sin proteína. Las Figuras 5.14. y 5.15. recogen los valores obtenidos correspondientes a la interacción FurC-FurA y FurC-FurB, respectivamente, normalizados a  $\text{CD}_{259\text{nm}} = 0$ .

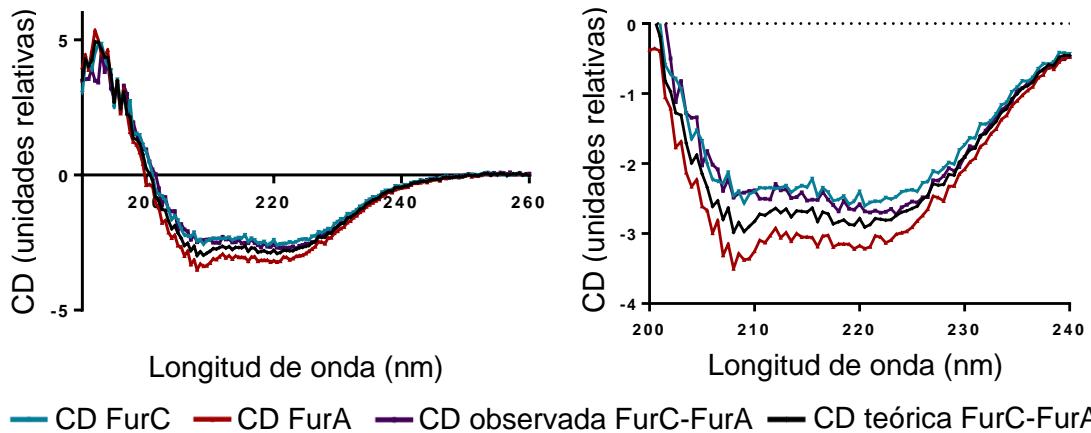


Figura 5.14. Perfil de CD para FurA 10  $\mu\text{M}$ , FurC 10  $\mu\text{M}$  y FurA(5  $\mu\text{M}$ )-FurC(5  $\mu\text{M}$ ). A la derecha, el espectro completo recogido; a la izquierda, detalle de la zona diferencial. Las curvas teóricas derivan de la suma ponderada de los perfiles individuales de las proteínas, normalizadas a 10  $\mu\text{M}$  de proteína total.

El perfil de CD de la mezcla de FurA y FurC a concentración total 10  $\mu\text{M}$  (Figura 5.14. – CD observada FurC-FurA) es visiblemente diferente al esperado de obtenerse únicamente la suma ponderada de los valores individuales (Figura 5.14. – CD teórica FurC-FurA), ya que es más cercano al perfil individual de FurC. Esto sugiere que FurA y FurC interactúan de forma que la estructura de al menos una de ellas se ve alterada, afectando a su comportamiento ante la luz polarizada a distintas longitudes de onda.

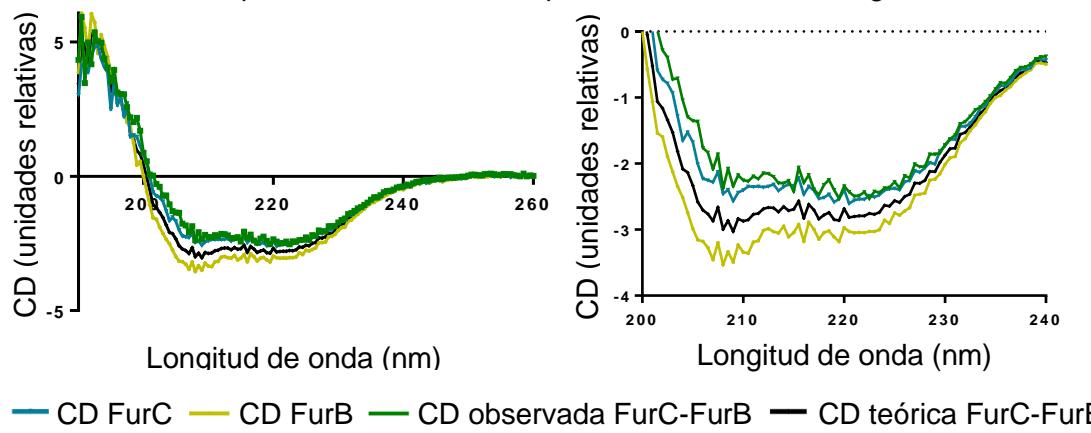


Figura 5.15. Perfil de CD para FurB 10  $\mu\text{M}$ , FurC 10  $\mu\text{M}$  y FurB(5  $\mu\text{M}$ )-FurC(5  $\mu\text{M}$ ). A la derecha, el espectro completo recogido; a la izquierda, detalle de la zona diferencial. Las curvas teóricas derivan de la suma ponderada de los perfiles individuales de las proteínas, normalizadas a 10  $\mu\text{M}$  de proteína total.

En el caso de la interacción entre FurB y FurC obtenemos resultados similares, alcanzando la mezcla real (Figura 5.15. – CD observada FurC-FurB) valores diferentes a los teóricos esperables (Figura 5.15. – CD teórica FurC-FurB), incluso más allá de la zona entre los perfiles individuales. Esto implicaría que la interacción entre FurB y FurC también podría causar cambios conformativos en al menos una de ellas.

La forma del perfil de CD también se ve alterada en ambos casos. Esto se puede observar en las diferencias en la relación entre el valor de CD a 222 nm y 208 nm, considerados como los mínimos aproximados en los perfiles de CD de una proteína rica en  $\alpha$ -hélices. La ratio de CD a 222 nm y 208 nm se puede emplear para evaluar estructuras proteicas, ya que las estructuras en  $\alpha$ -hélices aisladas muestran una relación de aproximadamente 0,9, mientras que para los arrollamientos de  $\alpha$ -hélices (dos  $\alpha$ -hélices dispuestas en ángulo de 20° en torno a zonas hidrófobas en contacto) es de 1,1 (33). Los valores de  $CD_{222\text{nm}}/CD_{208\text{nm}}$  derivados de los perfiles de CD teóricos y observados de las proteínas están recogidos en la Tabla 5.2..

	BSA-FurC		FurC-FurA		FurA-FurB	
	Teórica	Obs.	Teórica	Obs.	Teórica	Obs.
$CD_{222\text{nm}}/CD_{208\text{nm}}$	0,954	0,934	0,936	1,088	0,932	1,021

**Tabla 5.2. Ratios de CD a 222 nm y 208 nm para las distintas combinaciones de proteínas.** Incluidos los datos para la mezcla teórica y la observada (Obs.).

Al comparar la relación real y la observada para BSA y FurC, las cuales no interaccionan, la diferencia es mínima, mientras que tanto para FurC-FurB como para FurC-FurB el valor varía en gran medida. El desplazamiento del mínimo en el perfil de CD hacia 222 nm podría significar que esta interacción provoca una alteración estructural que favorece la formación de arrollamientos de  $\alpha$ -hélices.

## 6. Discusión

Las interacciones entre proteínas tienen consecuencias funcionales, que pueden ser clave en la adaptación al ambiente de los seres vivos. Las interacciones transitorias constituyen componentes clave en redes de señalización y regulación celulares que adaptan la fisiología celular en respuesta a cambios en las condiciones del medio en el que se encuentran (21). Un ejemplo de ello podría ser la proteína PII de *Anabaena* sp. PCC7120, que establece diferentes interacciones según la disponibilidad de nitrógeno, inclinando la balanza hacia la formación de reservas o la activación de la respuesta ante la deficiencia de nitrógeno (24). La regulación transcripcional, que lleva a la expresión diferencial de genes, puede depender de interacciones proteicas tanto en eucariotas (27) como en procariotas, con ejemplos como el de DhaR en *E. coli*, que en función del ratio celular ATP/ADP se ve regulado por el coactivador DhaL-ADP o el correpresor DhaK (26).

El presente trabajo buscaba avanzar en la caracterización de la interacción entre los tres reguladores transcripcionales de la familia FUR identificados en *Anabaena* sp. PCC7120 (FurA, FurB y FurC), dada su interregulación (14) y los precedentes sugiriendo su interacción, ya que en ensayos de ITC previos se detectó una interacción física *in vitro* entre FurC y FurA, y entre FurC y FurB (28).

### 6.1. Las proteínas FurC y FurB interaccionan *in vivo*

En el presente trabajo se ha confirmado que la interacción previamente descrita *in vitro* para las proteínas FurC y FurB es capaz de producirse también *in vivo*. Dicha interacción se observa claramente en medio LB tanto en condiciones de semianerobiosis como de aerobiosis, sugiriendo que es independiente del estado de oxidación de las proteínas. Estudios previos de nuestro laboratorio indicaban que la interacción detectada por ITC

tenía lugar tanto en presencia como en ausencia del agente reductor DTT (28), lo que estaría en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de doble híbrido.

Respecto a la reducción de la interacción en medio M9, dada la naturaleza indefinida del LB, es complicado determinar qué podría estar afectando a la interacción, que se observa en LB, pero sólo se intuye de forma leve *in vivo* en M9. Es posible que el LB contenga algún metabolito necesario para la interacción *in vivo*, de forma similar a lo que ocurre con el sistema PII/PipX/NtcA de cianobacterias, que se regula sensando la disponibilidad de nitrógeno a través del 2-oxoglutarato, el metabolito indicador del balance entre el carbono y el nitrógeno celular (34). En suficiencia de nitrógeno combinado, PipX interacciona con PII y tiene lugar la formación de reservas de nitrógeno, mientras que en deficiencia de nitrógeno el 2-oxoglutarato provoca que se establezca una interacción entre PipX y el regulador transcripcional NtcA, activando la expresión de genes de respuesta a deficiencia de nitrógeno (24).

Ya que FurB y FurC son capaces de interaccionar tanto entre sí como consigo mismas, es posible que estén involucradas en un sistema regulatorio similar que determine qué interacciones se establecen en cada momento según las necesidades celulares, aunque sería necesario realizar más experimentos para poder proponer qué factor o factores podrían estar regulando este sistema. En cuanto al significado fisiológico de esta interacción, se podría hipotetizar que implique una regulación conjunta de la respuesta ante el estrés oxidativo, ya que ambas regulan la expresión de genes de defensa a este estrés. En vista de que no se han encontrado en FurB dominios de respuesta a ROS, mientras que FurC responde a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35), se abre la posibilidad de que FurC actúe como sensor redox para que FurB ejecute su función reguladora de genes de defensa contra el estrés oxidativo.

La disponibilidad de cinc o manganeso no ha mostrado tener un efecto determinante individual sobre su interacción. El cinc, pese a su implicación como metal correpressor de FurB (18) y posible regulador del estado de oligomerización de estas proteínas (28), no mostró ser un factor determinante de la interacción en M9 por doble híbrido. En relación a que FurC se corresponda al homólogo PerR de *Anabaena* sp. PCC7120 (19), de tratarse de esta proteína, su estado sería más oxidado en ausencia de manganeso al no poder inhibir su oxidación catalizada por metales. Dado que no se han observado diferencias en los ensayos de doble híbrido con o sin manganeso, parece que esta oxidación no está afectando a la interacción.

## 6.2. Las proteínas FurC y FurA no interaccionan *in vivo* en las condiciones probadas en este trabajo

Aunque los resultados obtenidos *in vitro* anteriormente (28) sugerían una interacción entre FurA y FurC, esta interacción no se ha podido observar en los ensayos de doble híbrido realizados. Esto no implica que no tenga lugar *in vivo*, pero sí que las condiciones ensayadas no son las adecuadas para observarla. No se puede descartar que la aireación o las alteraciones del medio de cultivo afecten a esta interacción, ya que podrían ser capaces de hacerlo únicamente una vez iniciada por otros factores. Únicamente podemos proponer que el cultivo en un ambiente más reductor, con glucosa como única fuente de carbono o en ausencia de manganeso o cinc no son en sí suficientes para observar la interacción.

### 6.3. Un aumento en la fuerza iónica del medio es capaz de reducir la interacción *in vitro* de FurC/FurB y de FurC/FurA.

Los ensayos de ITC en presencia de NaCl permitieron observar un significativo descenso en la afinidad de FurC por FurA y FurB *in vitro*. Las sales como el NaCl son capaces de inducir el desmantelamiento de complejos proteicos cuyos componentes establecen interacciones de tipo electrostático entre cargas opuestas, en este caso por la disociación a iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que pueden interaccionar con estas cargas, eliminando fuerzas electrostáticas que estabilizaban el complejo (30). Este hecho se observa en diferentes proteínas, como las abrazaderas  $\beta$  de *E. coli*, que forman dímeros estabilizados por interacciones electrostáticas para permitir la replicación del DNA y se disocian a monómeros a concentraciones crecientes de NaCl (36). De esta forma, los resultados obtenidos indican que la interacción de FurC con FurB y FurA tiene al menos un componente electrostático, siendo el NaCl capaz de reducir su afinidad. Sin embargo, sería conveniente realizar más ensayos y a diferentes concentraciones a fin de valorar con mayor fiabilidad su implicación.

Cabe destacar que las interacciones electrostáticas tienen un papel particularmente importante en la formación de heterodímeros y homodímeros: los homodímeros, compuestos de monómeros idénticos, no pueden tener cargas netas opuestas, mientras que proteínas diferentes sí, permitiendo el establecimiento de este tipo de interacciones (30). Teniendo esto en cuenta, la alteración de la fuerza iónica del medio podría ser capaz de regular el equilibrio entre homodímeros y heterodímeros Fur.

Ambos medios empleados para los ensayos de doble híbrido contenían NaCl, 2 g/L en el caso del LB mientras que el M9 contiene 0,5 g/L. A primera vista, el hecho de no observar interacción en M9, pero sí en LB, que contiene más NaCl, no encaja con la menor interacción observada por ITC al añadir esta sal. No obstante, ambos medios contienen otras sales en diferentes cantidades, cada cual con su propia naturaleza y comportamiento electrostático difícil de predecir por su grado de disociación o sus cargas (30), con lo que no se puede afirmar que la acción del NaCl *in vivo* sea diferente a la que tiene *in vitro*, ya que los resultados observados dependen de más factores.

### 6.4. La interacción entre FurC/FurB y FurC/FurA promueve un cambio en su estructura secundaria.

Como se muestra en resultados, el análisis de dicroísmo circular para FurC/FurB y FurC/FurA generó perfiles distintos a los que se habrían obtenido para una mezcla de proteínas sin interaccionar entre sí. Se observó una alteración estructural sugiriendo un enriquecimiento en estructuras de tipo arrollamiento de  $\alpha$ -hélices. El control con BSA y FurC generó un perfil prácticamente idéntico al teórico, por lo que se puede considerar que esta alteración estructural es un efecto específico de la interacción entre las proteínas de estudio. Ciertas proteínas, como SsuE y SsuD de *E. coli*, interaccionan sin sufrir alteraciones estructurales, generando perfiles de CD equivalentes a la suma ponderada de sus perfiles individuales (37). Por el contrario, diferencias entre los perfiles de CD teóricos y los observados para mezclas proteicas implican cambios estructurales derivados de su interacción. Esto puede tener consecuencias relevantes, como en el caso de las proteínas humanas Arf y Hdm2: su interacción induce la formación de estructuras de tipo lámina- $\beta$ , impidiendo la unión de Hdm2 a p53, que queda libre para bloquear la entrada al ciclo celular (38). Retomando el ejemplo anteriormente

mencionado de PipX, su unión a NtcA induce la estabilización de la conformación activa del factor transcripcional, con mayor afinidad por el 2-oxoglutarato y el DNA, activando la expresión de los genes que regula (24). De esta forma, la alteración estructural derivada de la interacción entre FurC y FurB o FurC y FurA podría tener consecuencias funcionales, modulando sus acciones individuales o ejerciendo otras nuevas.

Aunque los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo han permitido avanzar en el estudio de las interacciones entre los parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120, es necesario realizar más ensayos a fin de determinar los factores que las gobiernan, así como verificar finalmente si FurA y FurC son capaces de interaccionar *in vivo*, a fin de alcanzar una mejor comprensión de la complejidad de la red regulatoria gobernada e integrada por los parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120.

## 7. Conclusiones

La realización de este trabajo ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones sobre las interacciones entre las proteínas FurA, FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC7120:

1. Las proteínas FurB y FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 son capaces de interaccionar entre sí *in vivo* en condiciones específicas, pero de forma independiente del estado redox.
2. No se ha observado interacción *in vivo* entre las proteínas FurA y FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante ensayos de doble híbrido en medio LB o medio mínimo M9, independientemente del estado redox o disponibilidad de zinc o manganeso.
3. Un aumento en la fuerza iónica reduce la afinidad *in vitro* entre FurC/FurB y FurC/FurA observada por ITC, sugiriendo que su interacción tiene al menos un componente electrostático.
4. La interacción de FurC con FurA y FurB parece provocar una alteración conformacional en al menos una de ellas, adquiriendo el complejo un mayor contenido en estructuras de tipo arrollamiento de  $\alpha$ -hélices.

## Conclusions

The present work has allowed us to reach the following conclusions on the interactions between the proteins FurA, FurB and FurC of *Anabaena* sp. PCC7120:

1. The proteins FurB and FurC of *Anabaena* sp. PCC7120 can interact *in vivo* in specific circumstances, with no dependence on their redox state.
2. No interaction has been reported *in vivo* between the proteins FurA and FurC of *Anabaena* sp. PCC7120 through two-hybrid assays in LB medium or M9 minimal medium, independently of their redox state or zinc and manganese availability.
3. An increase in ionic strength results in a decrease of the *in vitro* affinity between FurC/FurB and FurC/FurA, as observed by ITC, which suggests this interaction is at least partly electrostatic in nature.
4. The interaction of FurC with FurA and FurB appears to cause a conformational change in at least one of them, as the complex is enriched in coiled-coil motifs.

## 8. Bibliografía

1. Whitton BA, Potts M. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers; 2002.
2. Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120. 2012; 194(10): 2426-2436;
3. Garlapati D, Chandrasekaran M, Devanesan A, Mathimani T, Pugazhendhi A. Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103(12): 4709–21.
4. Coleman JE. Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61(1): 897–946.
5. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 546: 41–52.
6. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11(7): 443–54.
7. Pérard J, Covès J, Castellan M, Solard C, Savard M, Miras R, et al. Quaternary Structure of fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry*. 2016; 55(10): 1503–15.
8. Bags A, Neilands JB. Ferric Uptake Regulation Protein Acts as a Repressor, Employing Iron(II) as a Cofactor To Bind the Operator of an Iron Transport Operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1987; 26(17): 5471–7.
9. Cissé C, Mathieu S V., Abeih MBO, Flanagan L, Vitale S, Catty P, et al. Inhibition of the Ferric Uptake Regulator by Peptides Derived from Anti-FUR Peptide Aptamers: Coupled Theoretical and Experimental Approaches. *ACS Chem Biol*. 2014; 9(12): 2779–86.
10. Ernst FD, Homuth G, Stoof J, Mäder U, Waidner B, Kuipers EJ, et al. Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactor superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol*. 2005; 187(11): 3687–92.
11. Gaballa A, Helmann JD. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 1998; 180(22): 5815–21.
12. Huang D-L, Tang D-J, Liao Q, Li H-C, Chen Q, He Y-Q, et al. The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(13): 4295–309.
13. Lee J-W, Helmann JD. The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*. 2006; 440(7082): 363–7.
14. Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 236(3): 275–82.
15. González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. Hess WR, editor. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0151384.
16. Botello-Morte L, Bes MT, Heras B, Fernández-Otal Á, Peleato ML, Fillat MF. Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC7120: Disulfide Reductase Activity Based on its CXXC Motifs. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(9): 1396–406.
17. Lopez-Gomollón S, Hernandez JA, Wolk CP, Peleato ML, Fillat MF et al. Expression of *furA* is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology*. 2007; 153(1): 42–50.
18. Sein-Echaluce VC, Pallarés MC, Lostao A, Yruela I, Velázquez-Campoy A, Luisa Peleato M, et al. Molecular basis for the integration of environmental signals by FurB from *Anabaena* sp. PCC7120. *Biochem J*. 2018; 475(1): 151–68.

19. Yingping F, Lemeille S, Talla E, Janicki A, Denis Y, Zhang C-C, et al. 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* PCC7120. *Environ Microbiol Rep.* 2014; 6(5):468–75.
20. Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, et al. Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2019; pii: pcz094
21. Acuner Ozbabacan SE, Engin HB, Gursoy A, Keskin O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng Des Sel.* 2011; 24(9): 635–48.
22. Bhagavan NV, Ha C-E. Three-Dimensional Structure of Proteins and Disorders of Protein Misfolding. In: *Essentials of Medical Biochemistry*. Elsevier; 2015;; 31–51.
23. Lv Q, Ma W, Liu H, Li J, Wang H, Lu F, et al. Interactions and protein function exploration in cyanobacteria. *Sci Rep.* 2015 Oct 22; 5: 15519.
24. Forcada-Nadal A, Llácer JL, Contreras A, Marco-Marín C, Rubio V. The PII-NAGK-PipX-NtcA Regulatory Axis of Cyanobacteria: A Tale of Changing Partners, Allosteric Effectors and Non-covalent Interactions. *Front Mol Biosci.* 2018; 5: 91.
25. Ouhammouch M, Adelman K, Harvey SR, Orsini G, Brody EN. Bacteriophage T4 MotA and AsiA proteins suffice to direct *Escherichia coli* RNA polymerase to initiate transcription at T4 middle promoters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(5): 1451–5.
26. Bächler C, Schneider P, Bähler P, Lustig A, Erni B. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J.* 2005;24(2):283–93.
27. Funnell APW, Crossley M. Homo- and Heterodimerization in Transcriptional Regulation. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;; 105–21.
28. Sarasa-Buisan C. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza;
29. Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System BACTH System Kit Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit. Euromedex.
30. Zhang Z, Witham S, Alexov E. On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys Biol.* 2011; 8(3): 035001.
31. Boudker O, Oh S. Isothermal titration calorimetry of ion-coupled membrane transporters. *Methods.* 2015; 76: 171-182.
32. Ranjbar B, Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review. *Chem Biol Drug Des.* 2009 Aug; 74(2): 101-20
33. Zheng T, Boyle A, Robson Marsden H, Valdink D, Martelli G, Raap J, et al. Probing coiled-coil assembly by paramagnetic NMR spectroscopy. *Org Biomol Chem.* 2015; 213(4) :1159–68.
34. Huergo LF, Dixon R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79(4):419-35.
35. Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, et al. Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant and Cell Physiology*; pcz094,
36. Binder JK, Douma LG, Ranjit S, Kanno DM, Chakraborty M, Bloom LB, et al. Intrinsic stability and oligomerization dynamics of DNA processivity clamps. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(10): 6476–86.
37. Abdurachim K, Ellis HR. Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006; 188(23): 8153–9.
38. Bothner B, Lewis WS, DiGiammarino EL, Weber JD, Bothner SJ, Kriwacki RW. Defining the molecular basis of Arf and Hdm2 interactions. *J Mol Biol.* 2001; 314(2): 263–77

## 9. Anexos

### 9.1. Cepas empleadas en los ensayos de doble híbrido

Cepa	Plásmidos que contiene		Cepa	Plásmidos que contiene	
C-	pUT18c	pKT25	BC1	pUT18c-FurB	pKT25-FurC
C+	pUT18c-Zip	pKT25-Zip	BC2	pUT18c-FurB	pKNT25-FurC
AC1	pUT18c-FurA	pKT25-FurC	BC3	pUT18-FurB	pKT25-FurC
AC2	pUT18c-FurA	pKNT25-FurC	BC4	pUT18-FurB	pKNT25-FurC
AC3	pUT18-FurA	pKT25-FurC	BC5	pUT18c-FurC	pKT25-FurB
AC4	pUT18-FurA	pKNT25-FurC	BC6	pUT18c-FurC	pKNT25-FurB
AC5	pUT18c-FurC	pKT25-FurA	BC7	pUT18-FurC	pKT25-FurB
AC6	pUT18c-FurC	pKNT25-FurA	BC8	pUT18-FurC	pKNT25-FurB
AC7	pUT18-FurC	pKT25-FurA			
AC8	pUT18-FurC	pKNT25-FurA			

**Tabla 9.1.** Relación de plásmidos que contiene cada una de las cepas empleadas en los ensayos de doble híbrido con el kit BACTH. Cepas proporcionadas por el grupo de Regulación Génica y fisiología de cianobacterias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

### 9.2. SDS-PAGE

	Gel separador 17%	Gel concentrador 5%
<i>H<sub>2</sub>O destilada</i>	0,36 mL	1,4 mL
<i>Tris 1,5 M pH 8,8</i>	2,24 mL	
<i>Tris 0,5 M pH 6,8</i>		0,25 mL
<i>Acrilamida/Bisacrilamida 30%</i>	3,4 mL	0,33 mL
<i>SDS 10%</i>	30 µL	10 µL
<i>PSA 10%</i>	20 µL	10 µL
<i>TEMED</i>	10 µL	10 µL

**Tabla 9.2.** Composición de un gel de electroforesis SDS-PAGE con 17% de acrilamida, incluyendo la del gel concentrador (5% en acrilamida).

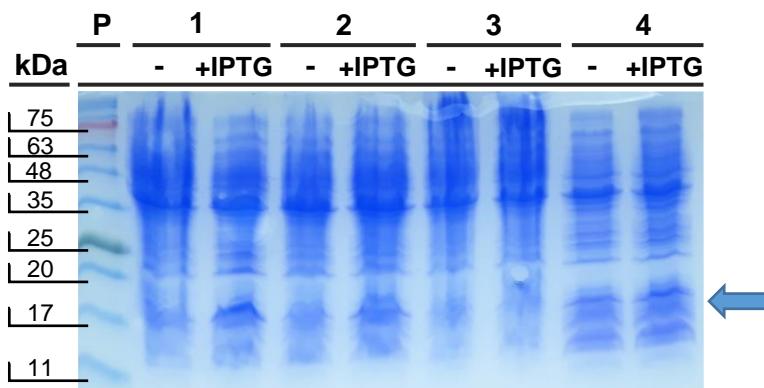
Compuesto	Concentración
<i>Azul de Coomasie</i>	0,25% (w/v)
<i>Metanol</i>	45% (v/v)
<i>Acético glacial</i>	10% (v/v)
<i>H<sub>2</sub>O destilada</i>	(Aforar al volumen deseado)

**Tabla 9.3.** Composición de una solución de tinción de proteínas basada en Azul de Coomasie para geles de electroforesis.

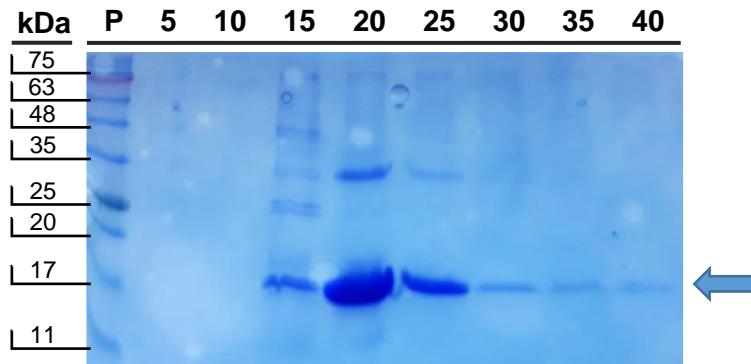
Compuesto	Concentración (v/v)
<i>Metanol</i>	25%
<i>Ácido acético</i>	10%
<i>H<sub>2</sub>O destilada</i>	65%

**Tabla 9.4.** Composición de una solución de destinción de geles de proteínas teñidos con Azul de Coomasie.

### 9.3. Purificación de FurB



**Figura 9.1. Sobreexpresión de FurB/His-Tag de *Anabaena* sp. PCC 7120 en *E. coli* BL21. Gel de SDS-PAGE 17% teñido con Azul de Coomassie.** El carril P contiene el patrón de pesos moleculares NZY Colour Protein Marker II, con las correspondencias de peso molecular en kDa a la izquierda. Los números 1-4 indican la colonia cuya muestra se ha introducido al carril, tras inducir la expresión (+IPTG) o no (-). Señalada con una flecha la localización aproximada de FurB/His-Tag. La colonia finalmente elegida fue la número 1.



**Figura 9.2. Alícuotas eluidas de la columna Zn+2-IMAC. Gel de SDS-PAGE 17% teñido con azul Coomassie.** El carril P contiene el patrón de pesos moleculares NZY Colour Protein Marker II, con las correspondencias de peso molecular en kDa a la izquierda. La alícuota a la que se corresponde cada carril viene indicada por el número en la zona superior. Señalada con una flecha la banda correspondiente a FurB/His-Tag.