



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis  
Universidad de Sevilla  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



## Estudio funcional y estructural de las isoformas del citocromo $c_6$



Alejandro Torrado Maya  
Marzo 2017





Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis  
Universidad de Sevilla  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



# Estudio funcional y estructural de las isoformas del citocromo $c_6$

Memoria presentada por el Licenciado Alejandro  
Torrado Maya para optar al grado de Doctor en Biología  
por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2017

Director

Dr. Fernando Publio Molina Heredia  
Profesor Titular de Universidad



*A las cianobacterias,  
Sin ellas, nada de esto hubiera sido posible.*



Mientras los sueños no tengan fin, el camino será ilimitado.  
Solo el miedo puede detenerte.

*Flatley*



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar este apartado agradeciendo a la gente que me inició en este mundillo, bien por suerte o por desgracia. Al primero que quiero agradecer su ayuda es a José A. Monreal, que fue el primero que me echó un cable para entrar en el ambiente investigador en el departamento de Microbiología. A la gente del departamento de Microbiología, en el que estuve un par de años, les quiero agradecer su apoyo y sus enseñanzas; sobre todo a Nuria y Rocío, que fueron las que me enseñaron desde cero en las cocinas. De esa etapa, quiero agradecer a Rosario Espuny el que me acogiese y me tratase como uno más. Si no fuese por "Charo", no habría conocido al que sería mi director de tesis.

A Fernando Publio Molina Heredia, mi director de tesis, le quiero dar sinceramente las gracias. No solo confió en mí, un estudiante normal y corriente, sin grandes calificaciones, sino que me dio la oportunidad de desarrollar el trabajo de tesis que tienen ante ustedes. Con el paso del tiempo se ha convertido en una figura muy importante en mi vida y lo considero un verdadero amigo. Siempre voy a estar en deuda contigo, Fernando.

También quiero agradecer a todo el grupo de investigación, que me han ayudado siempre que lo he necesitado. A Pepe Navarro, Manolo Hervás, Mercedes Roncel y José M. Ortega. De verdad, muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado. A la otra parte del grupo de investigación, los "indios", no puedo sino estar igualmente agradecido por todo. A Pilar Bernal, que fue la que me enseñó a conciencia a trabajar en un laboratorio de Bioquímica, muchas veces a golpe de regañinas pero con mucho cariño y pasión, le quiero igualmente agradecer su apoyo, sus lunes por la mañana con historias, sus "cafelillos", el escándalo que formamos hablando y su amistad. A Leonor Puerto, muchísimas gracias por todo, porque entre tu y Pilar habéis hecho de mi un profesional del campo. El L7 nunca fue lo mismo sin ti. También quiero agradecer a gente que estuvo en nuestro grupo pero que siguió otro camino, como Ana López, que en poco tiempo fue una más de nosotros y una verdadera amiga. Así mismo, agradecer a una compañera que intenta abrirse un hueco en este oficio, Mari Carmen Castell, por esa energía y esa ilusión por todo y a nuestra técnico de laboratorio compartida, Soiartze, siempre diligente y dispuesta a aprender.

Quiero agradecer también a dos compañeros de fatigas, que a pesar de no estar en mi grupo eran parte indispensable del día a día, Javier Santamaría e Isidro Álvarez, por aguantarnos mutuamente, por las cervezas de los viernes y por su amistad. El día que montéis el bar, allí me tendréis. De igual forma, hay mucha gente del IBVF a la que debo agradecer mucho, por hacer que mi experiencia en el centro haya sido tan gratificante día tras día. A Félix Ramos, compañero desde la carrera y un gran amigo, gracias por todo (sobre todo por tus apuntes). A Enrique Flores y Antonia Herrero y su grupo agradecerles la ayuda prestada para la manipulación de Nostoc/Anabaena. A los vecinos del laboratorio L6 también agradecerlos por todo, Elvira, Manuel, Alicia y Agustín,

que a pesar de armar mucho escándalo me han aguantado estoicamente. No puedo enumerar a todo el mundo, pero sabéis que estáis en mis pensamientos.

Este apartado se lo quiero dedicar a mis amigos, los otros sufridores de la tesis. David y Adrián, la triada de la muerte, mis amigos de la infancia y sin duda, mis mejores amigos, hermanos de vida. No sabéis la suerte que tengo de teneros a los dos. Gracias a ellos conocí a May y Belén, a las que considero unas grandes amigas y parte indispensable de mi vida. Gracias. También ocupa un lugar muy importante dos grandes amigos que conocí en la universidad pero que me llevo para toda la vida, Juanca y Rafa, los mosqueteros. No sé qué habría sido de mí en la facultad sin vosotros. También hay mucha gente, muchos amigos, que me han apoyado y que sé que puedo contar con ellos: Esthercita, Espe, Cristina, Irene, Nando y Sara.

Quiero agradecer también a mi familia, por haberme apoyado, por habérmelo dado todo y por confiar ciegamente en mí. A mis padres, los pilares de mi vida, gracias por todo. Es un orgullo ser vuestro hijo. A mis hermanos, que son dos soles, compañeros de juegos o de festivales. Es un orgullo ser vuestro hermano. También a toda la familia que ha estado ahí siempre. Gracias. No puedo olvidarme de mi familia política, a la que debo también mucho. Muchísimas gracias por aceptarme y tratarme como uno más de la familia

Por último, pero no por ello menos importante, quiero darle las gracias a la persona más importante de mi vida, sin lugar a dudas, Marta Rodríguez. Me has hecho el hombre más feliz del mundo desde el momento en el que nuestras vidas se cruzaron en el camino allá por el 2005, llegando a la culminación cuando aceptaste ser mi esposa en 2016. Eres la mejor compañera de viaje que podría haber esperado nunca. Tú eres mi familia.





<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>15</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>18</b>
<b>ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA</b>	<b>19</b>
<b>COMPOSICIÓN DE TAMPONES</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
1.1. Las cianobacterias	25
1.1.1. Heterocistos	31
1.2. Las cadenas fotosintética y respiratoria en cianobacterias	33
1.2.1. La cadena fotosintética	33
1.2.2. La cadena respiratoria	35
1.3. Citocromo $c_6$ y plastocianina	37
1.3.1. Citocromo $c_6$	37
1.3.2. Plastocianina	39
1.4. Citocromos alternativos	41
1.4.1. Citocromo $c_{6-2}$	42
1.4.2. Citocromo $c_M$	43
1.4.3. Citocromo $c_{6A}$	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>51</b>
3.1. Organismos y condiciones de cultivo	53
3.1.1. <i>Nostoc</i>	53
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	55
3.2. Métodos de manipulación de DNA <i>in vitro</i>	57
3.2.1. Aislamiento y purificación de DNA genómico de <i>Nostoc</i>	58
3.2.2. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	60
3.2.3. Aislamiento de RNA de <i>Nostoc</i>	60
3.2.4. Análisis de ácidos nucleicos	61
3.2.4.1. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos en solución	61
3.2.4.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	61
3.2.4.3. Purificación de fragmentos de DNA	61
3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
3.2.5.1. PCR	62
3.2.5.2. PCR de colonias	62
3.2.6. Retrotranscripción	63
3.2.7. PCR cuantitativa (qPCR)	63

3.2.8. Diseño racional de genes sintéticos	63
3.2.9. Manipulación enzimática del DNA	64
3.2.9.1. Restricción de DNA	64
3.2.9.2. Clonación de fragmentos de DNA	65
3.2.9.3. Secuenciación del DNA	65
3.3. Métodos de transformación genética	66
3.3.1. Transformación de <i>E. coli</i>	66
3.3.1.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	66
3.3.1.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	66
3.3.2. Conjugación en <i>Nostoc</i>	67
3.4. Purificación de membranas y metaloproteínas	68
3.4.1. Preparación de membranas enriquecidas en oxidasas terminales	68
3.4.2. Preparación de membranas enriquecidas en PS I	69
3.4.3. Expresión y purificación de metaloproteínas recombinantes de <i>Nostoc</i> en <i>E. coli</i>	70 71
3.4.4. Expresión y purificación del citocromo $c_6$	71
3.4.5. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-2}$	72
3.4.6. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-3}$	73
3.4.7. Expresión y purificación del citocromo $c_M$	74
3.4.8. Expresión y purificación del citocromo <i>f</i>	74
3.4.9. Expresión y purificación de la plastocianina	75
3.5. Determinaciones analíticas	76
3.5.1. Cuantificación de proteínas	76
3.5.2. Electroforesis analítica en geles de SDS-Poliacrilamida	76
3.5.3. Tinción de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida	77
3.5.4. Detección inmunológica de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida mediante <i>Western Blot</i>	77
3.5.5. Determinación de la concentración de clorofila y de PS I de <i>Nostoc</i> en solución	78
3.5.6. Espectro, concentración y pureza de las metaloproteínas	79
3.5.7. Determinación del coeficiente de extinción milimolar de los citocromos $c_{6-3}$ y $c_M$	80
3.5.8. Determinación del punto isoelectrónico de las metaloproteínas	80
3.5.9. Potenciometría rédox	80
3.5.10. Determinación de la tasa de consumo de $O_2$	82
3.5.11. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	82
3.5.12. Determinación del peso molecular por MALDI-TOF	83
3.5.13. Secuenciación del extremo N-terminal	83
3.6. Cristalografía de rayos-X	83
3.7. Espectrofotometría cinética inducida por láser	84
3.8. Técnicas microscópicas	86

3.8.1. Microscopía óptica	86
3.8.2. Microscopía confocal láser para la visualización de la <i>GFP</i>	86
3.8.3. Microscopía de fluorescencia	87
3.8.3.1. Visualización de la <i>GFP</i>	87
3.8.3.2. Inmunofluorescencia	87
3.9. Análisis bioinformático	88
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
4.1. Citocromo $c_{6-3}$	91
4.1.1. Clonación del gen <i>petJ-3</i>	92
4.1.2. Análisis de la secuencia del citocromo $c_{6-3}$	93
4.1.3. Modelo estructural del citocromo $c_{6-3}$	101
4.1.4. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-3}$	104
4.1.5. Caracterización físico-química del citocromo $c_{6-3}$	105
4.1.6. Análisis funcional del citocromo $c_{6-3}$	109
4.1.6.1. Interacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y el citocromo <i>f</i>	110
4.1.6.1.1. Calorimetría de titulación isotérmica	110
4.1.6.1.2. <i>Docking</i> molecular entre el citocromo $c_{6-3}$ y el citocromo <i>f</i>	111
4.1.6.2. Interacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y el PS I	113
4.1.6.3. Reacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3	114
4.1.7. Localización subcelular del citocromo $c_{6-3}$	117
4.2. Citocromo $c_{6-2}$	122
4.2.1. Interacción entre el citocromo $c_{6-2}$ y el citocromo <i>f</i>	122
4.2.2. Reacción entre el citocromo $c_{6-2}$ y las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3	124
4.2.3. Localización subcelular del citocromo $c_{6-2}$	125
4.3. Citocromo $c_M$	127
4.3.1. Clonación del gen <i>cytM</i> , expresión y purificación de citocromo $c_M$	128
4.3.2. Caracterización físico-química del citocromo $c_M$	133
4.3.3. <i>Docking</i> molecular del citocromo $c_M$	136
4.3.4. Análisis funcional del citocromo $c_M$	139
4.3.4.1. Interacción entre el citocromo $c_M$ y el PS I	139
4.3.4.2. Reacción entre el citocromo $c_M$ y las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3	140
4.3.5. Localización subcelular del citocromo $c_M$	141
4.4. Citocromo $c_6$ y plastocianina	142
4.4.1. Localización subcelular de citocromo $c_6$ y plastocianina	142
4.4.2. Reacción del citocromo $c_6$ y plastocianina con las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3	145

<b>5. CONSIDERACIONES GENERALES</b>	<b>147</b>
5.1. Localización subcelular de los citocromos alternativos	<b>150</b>
5.2. Posible función de los citocromos alternativos en fotosíntesis	<b>151</b>
5.3. Posible función de los citocromos alternativos en respiración	<b>152</b>
5.4. Papel del citocromo $c_6$ y de la plastocianina en fotosíntesis y respiración	<b>153</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>161</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las cianobacterias	27
Figura 2.	Micrografía de transmisión electrónica de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	32
Figura 3.	Esquema de las cadenas de electrones fotosintética y respiratoria en cianobacterias	34
Figura 4.	Modelo tridimensional del citocromo $c_6$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	37
Figura 5.	Modelo tridimensional de la plastocianina de <i>Anabaena variabilis</i>	39
Figura 6.	Esquema del sistema de medida utilizado para la determinación de los potenciales rédox	81
Figura 7.	Fotografía y esquema del sistema de espectrofotometría cinética inducida por láser	85
Figura 8.	Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR	93
Figura 9.	Plásmido pEAC63 para la expresión del citocromo $c_{6-3}$	94
Figura 10.	Secuencia de la ORF del gen <i>petJ-3</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 y de la proteína citocromo $c_{6-3}$	95
Figura 11.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los citocromos $c_6$ , $c_{6-2}$ y $c_{6-3}$ , de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	95
Figura 12.	Predicción del péptido de tránsito del citocromo $c_{6-3}$	96
Figura 13.	Predicción de la estructura secundaria del citocromo $c_{6-3}$	97
Figura 14.	Árbol filogenético de los diferentes citocromos de tipo $c$ solubles, con coordinación Histidina-Metionina, presentes en organismos fotosintéticos	99
Figura 15.	Modelo tridimensional de la estructura del citocromo $c_{6-3}$	101
Figura 16.	Superposición de los modelos estructurales de los citocromos $c_6$ y $c_{6-3}$	102
Figura 17.	Comparación de los potenciales electrostáticos de superficie de los citocromos $c_6$ y $c_{6-3}$	103
Figura 18.	Espectro de absorción UV/Vis del citocromo $c_{6-3}$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	106
Figura 19.	Análisis por MALDI-TOF del citocromo $c_{6-3}$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 expresado en <i>E. coli</i>	107
Figura 20.	Titulación potenciométrica rédox de los citocromos $f$ , $c_6$ y $c_{6-3}$ a pH 7,0	108
Figura 21.	Titulación potenciométrica rédox de los citocromos $c_6$ y $c_{6-3}$ a pH 4,0	109
Figura 22.	Calorimetría de titulación isotérmica del complejo citocromo $c_{6-3}$ /citocromo $f$	111
Figura 23.	<i>Docking</i> molecular de la interacción entre citocromo $c_6$ /citocromo $f$ y citocromo $c_{6-3}$ /citocromo $f$	112
Figura 24.	Transferencia electrónica desde los citocromos $c_6$ y $c_{6-3}$ al fotosistema I	113
Figura 25.	Reacción del citocromo $c_{6-3}$ con las oxidasas terminales de cultivos de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	115

Figura 26.	Reacción del citocromo $c_{6-3}$ con mutantes de las oxidasas terminales de heterocistos de cultivos de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	<b>116</b>
Figura 27.	Inmunodetección del citocromo $c_{6-3}$ mediante análisis de <i>Western Blot</i>	<b>118</b>
Figura 28.	Inmunodetección mediante análisis de localización por inmunofluorescencia del citocromo $c_{6-3}$	<b>119</b>
Figura 29.	Expresión relativa de los genes <i>petJ</i> y <i>petJ-3</i> por qPCR	<b>120</b>
Figura 30.	Estudio mediante microscopía de la región promotora del citocromo $c_{6-3}$ mediante visualización con GFP	<b>121</b>
Figura 31.	Calorimetría de titulación isotérmica del complejo citocromo $c_{6-2}$ /citocromo <i>f</i>	<b>123</b>
Figura 32.	<i>Docking</i> molecular de la interacción entre citocromo $c_6$ /citocromo <i>f</i> y citocromo $c_{6-2}$ /citocromo <i>f</i>	<b>124</b>
Figura 33.	Reacción del citocromo $c_{6-2}$ con las oxidasas terminales de distintas preparaciones de membranas de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 silvestre y de sus mutantes $\Delta Cox2$ y $\Delta Cox3$	<b>125</b>
Figura 34.	Estudio de fluorescencia mediante microscopía confocal del citocromo $c_{6-2}$ , mediante visualización con <i>GFP</i>	<b>126</b>
Figura 35.	Secuencia de la ORF del gen <i>cytM</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 y de la proteína citocromo $c_M$	<b>128</b>
Figura 36.	Esquema de la obtención del gen quimérico que codifica el citocromo $c_M$ fusionado al péptido de tránsito de la plastocianina	<b>130</b>
Figura 37.	Secuencia de la ORF del gen <i>cytM</i> de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 optimizado para el uso de codones de <i>E. coli</i> , así como la secuencia de la proteína citocromo $c_M$	<b>131</b>
Figura 38.	Plásmido pEACM para la expresión del citocromo $c_M$	<b>132</b>
Figura 39.	Espectro de absorción UV/Vis del citocromo $c_M$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	<b>134</b>
Figura 40.	Análisis por MALDI-TOF del citocromo $c_M$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 expresado en <i>E. coli</i>	<b>135</b>
Figura 41.	Titulación potenciométrica rédox del citocromo $c_M$ a pH 7,0	<b>136</b>
Figura 42.	Modelo tridimensional de la estructura del citocromo $c_M$	<b>137</b>
Figura 43.	Comparación de los potenciales electrostáticos de superficie de los citocromos $c_6$ y $c_M$	<b>137</b>
Figura 44.	<i>Docking</i> molecular de la interacción entre citocromo $c_6$ /citocromo <i>f</i> y citocromo $c_M$ /citocromo <i>f</i>	<b>138</b>
Figura 45.	Transferencia electrónica desde los citocromos $c_6$ y $c_M$ al fotosistema I	<b>139</b>
Figura 46.	Interacción del citocromo $c_M$ con oxidasas terminales de cultivos de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	<b>140</b>
Figura 47.	Estudio de fluorescencia mediante microscopía confocal del citocromo $c_M$ , mediante visualización con <i>GFP</i>	<b>141</b>

Figura 48.	Localización subcelular del citocromo $c_6$ y de la plastocianina de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	143
Figura 49.	Localización subcelular del citocromo $c_6$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 en presencia de cobre	144
Figura 50.	Interacción del citocromo $c_6$ y plastocianina con oxidasas terminales de cultivos de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	145
Figura 51.	Esquema funcional propuesto para el citocromo $c_6$ y la plastocianina y su relación en fotosíntesis y respiración en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	154

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes mutantes de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119 desarrolladas en este trabajo	<b>53</b>
Tabla 2.	Medio de cultivo BG11 para cianobacterias	<b>54</b>
Tabla 3.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	<b>56</b>
Tabla 4.	Medio de cultivo LB para <i>E. coli</i>	<b>56</b>
Tabla 5.	Plásmidos generados en este trabajo	<b>58</b>
Tabla 6.	Plásmidos adicionales utilizados en este trabajo	<b>59</b>
Tabla 7.	Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo	<b>64</b>
Tabla 8.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas para la producción de las distintas metaloproteínas	<b>71</b>
Tabla 9.	Máximos de absorción en la banda $\alpha$ y la relación de pureza obtenida para los citocromos y la plastocianina estudiados	<b>79</b>
Tabla 10.	Características físico-químicas del citocromo $c_{6-3}$ de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7119	<b>109</b>
Tabla 11.	Propiedades termodinámicas de la calorimetría de los complejos citocromo $c_6$ /citocromo $f$ y citocromo $c_{6-3}$ /citocromo $f$	<b>110</b>
Tabla 12.	Valores cinéticos para la transferencia electrónica desde los citocromos $c_6$ y $c_{6-3}$ al fotosistema I	<b>114</b>
Tabla 13.	Propiedades termodinámicas de la calorimetría de los complejos citocromo $c_6$ /citocromo $f$ y citocromo $c_{6-2}$ /citocromo $f$	<b>123</b>
Tabla 14.	Pruebas de expresión del citocromo $c_M$ en <i>E. coli</i>	<b>130</b>
Tabla 15.	Pruebas de expresión del gen sintético del citocromo $c_M$ en <i>E. coli</i>	<b>133</b>
Tabla 16.	Comparación entre los parámetros físico-químicos del citocromo $c_M$ <i>Nostoc</i> y <i>Synechocystis</i>	<b>135</b>

## ABREVIATURAS

Ap	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BCSA	Batocuproína disulfonato sódico
bisacrilamida	N,N'-bis-metilen-acrilamida
Cit	Citocromo
Cm	Cloranfenicol
Cox	Citocromo <i>c</i> oxidasa
C-terminal	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
$E_{m,7}$	Potencial redox a pH 7,0
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-2 etanosulfónico
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilo Dalton
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
min	Minuto
n	Nucleótido
N-terminal	Amino terminal
ORF	Fase abierta de lectura
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de bases
Pc	Plastocianina
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PQ	Plastoquinona
PS	Fotosistema
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RNasa	Ribonucleasa
r	Relación de máxima absorbancia $A_{280}/A_{\text{banda } \alpha}$
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
s	Segundo
SDS	Laurilsulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidades
v/v	Relación volumen/volumen
<i>sf-GFP</i>	<i>Superfold-green fluorescent ptotein</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido

**Bases nitrogenadas**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo

**Aminoácidos**

A	Ala	Alanina	L	Leu	Leucina
R	Arg	Arginina	K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparragina	M	Met	Metionina
D	Asp	Aspartato	F	Phe	Fenilalanina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
E	Glu	Glutamato	S	Ser	Serina
Q	Gln	Glutamina	T	Thr	Treonina
G	Gly	Glicina	W	Trp	Triptófano
H	His	Histidina	Y	Tyr	Tirosina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina

## COMPOSICIÓN DE TAMPONES

### Tampón de carga de DNA

Azul de bromofenol al 0,25 % (p/v), xileno-cianol al 0,25 % (p/v) y glicerol al 30 % (v/v).

### Tampón de carga de proteínas

Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8), SDS al 8 % (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 20 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,25 % (p/v) y glicerol al 40 % (v/v).

### Tampón TBE

Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0).

### Tampón TE

Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM.

### Tampón TR

Tris-HCl 40 mM (pH 8,0),  $MgSO_4$  10 mM,  $CaCl_2$  1 mM.

### PBS

NaCl 26 mM, KCl 0,54 mM,  $Na_2HPO_4$  0,8 mM,  $KH_2PO_4$  0,352 mM.

### PBS-T

NaCl 26 mM, KCl 0,54 mM,  $Na_2HPO_4$  0,8 mM,  $KH_2PO_4$  0,352 mM Tween-20 al 0,05 % (v/v).

### Tampón de electroforesis

Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1 % (p/v) (pH 8,3).







## 1. INTRODUCCIÓN

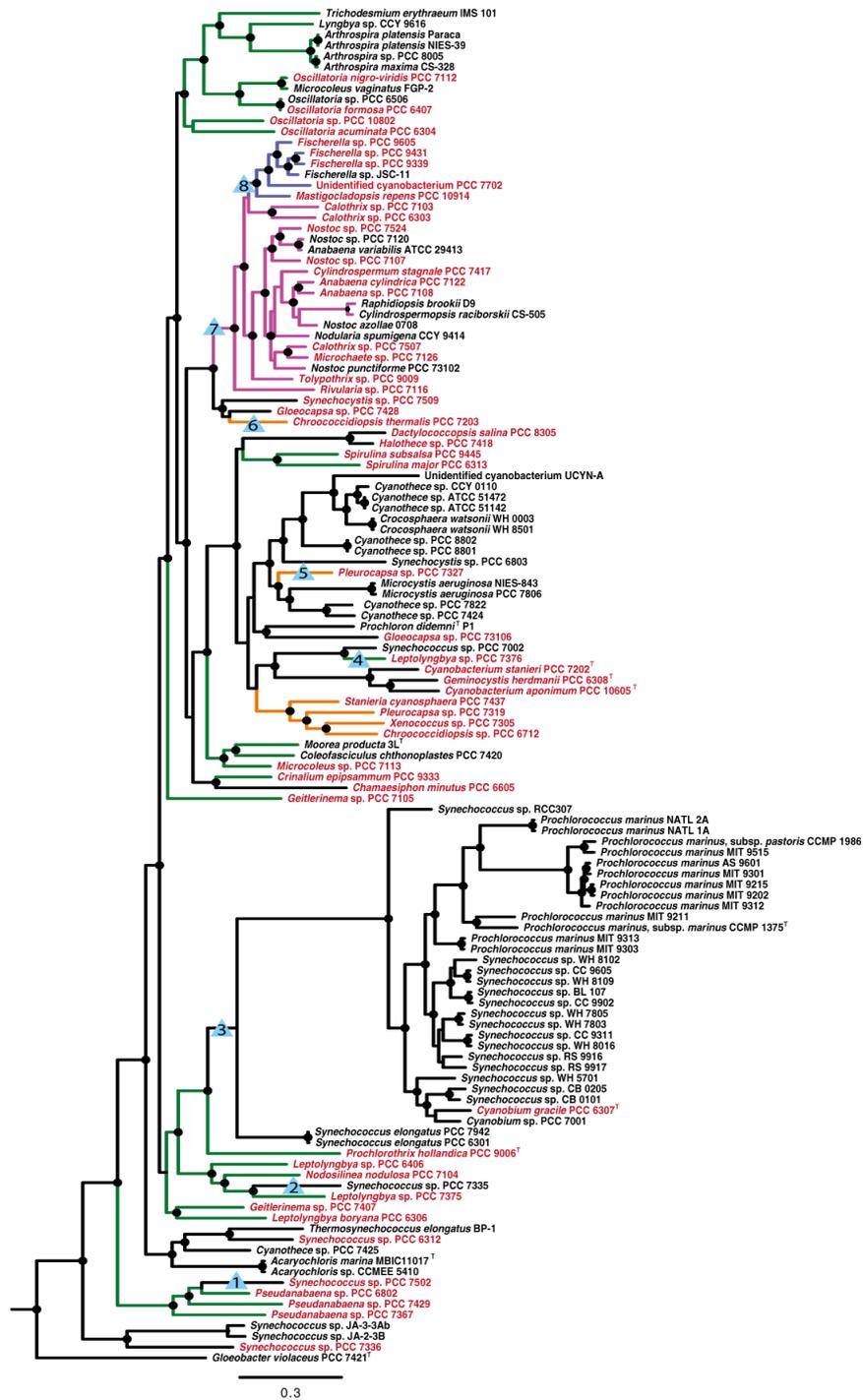
### 1.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un *phylum* muy diverso, aunque bien definido, de procariotas Gram negativos, capaces de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas [Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Woese, 1987]. Se considera a este grupo como el responsable del cambio de una atmósfera reductiva a oxidativa hace 3000 millones de años, siendo las principales causantes de la acumulación de oxígeno atmosférico en la Tierra [Knoll, 2008]. Además, está bien establecido que las cianobacterias son el ancestro viviente de los actuales cloroplastos [Knoll, 2008]. En la actualidad, estos organismos ocupan hábitats muy variados, llegando a encontrarse en la mayoría de ecosistemas estudiados [Tandeau de Marsac y Houmard, 1993]. De hecho, siguen jugando un papel crucial en los ciclos del carbono y del nitrógeno.

El *phylum* comprende a su vez organismos con diversa morfología, incluyendo organismos unicelulares, solitarios o formadores de colonias, y filamentosos, ya sea en filamentos lineales o presentando ramificaciones [Rippka *et al.*, 1979]. Algunas de estas cianobacterias filamentosas desarrollan una verdadera diferenciación celular, denominados heterocistos, que aparecen en condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado [Wolk, 1982]. Además de este tipo celular, algunas cianobacterias filamentosas pueden diferenciarse en acinetos o células de resistencia, o en hormogonios, células especializadas en reproducción y dispersión [Flores y Herrero, 2010]. Se ha establecido una clasificación filogenética, dividida en cinco secciones, basada en la diversidad morfológica que presentan estos organismos [Rippka *et al.*, 1979] y que ha sido actualizada recientemente por Shih y colaboradores [2013] (Figura 1). En la denominada Sección I se incluyen estirpes unicelulares como *Gloeocapsa* y *Synechocystis*, que se dividen por fisión binaria o por gemación. La Sección II la componen individuos unicelulares que presentan fisión múltiple, como

*Xenococcus* y *Pleurocapsa*. En la Sección III aparecen estirpes filamentosas que no son capaces (o han perdido la capacidad) de desarrollar heterocistos, como *Lyngbya* o *Trichodesmium*. Por último, en las Secciones IV y V encontramos las especies filamentosas formadoras de heterocistos, representando la Sección IV a las especies que presentan división en un plano, como *Anabaena* o *Nostoc*, mientras que en la Sección V se clasifican especies con división en más de un plano, con organismos como *Fischerella*.

Es importante resaltar que los plástidos presentes en eucariotas provienen de, al menos, una cianobacteria que fue internalizada, probablemente por fagocitosis [Raven *et al.*, 2009] y posterior endosimbiosis, hace unos 700-1500 millones de años [Yoon *et al.*, 2004; Cavalier-Smith, 2006], por una célula eucariota heterótrofa. Tras este evento, una gran cantidad de genes pasaron desde el genoma de la cianobacteria al núcleo del hospedador, lo que supuso la pérdida de genes cianobacterianos que no estaban implicados en la fotosíntesis oxigénica ni en el mantenimiento y división esencial del huésped. Este proceso se conoce como transferencia endosimbiótica de genes (EGT) [Martin y Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 2002; Reyes-Prieto *et al.*, 2007]. La endosimbiosis y transferencia de genes hizo que la célula huésped adquiriese la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica y que la ancestral cianobacteria se convirtiese en un auténtico orgánulo. Durante el suceso de endosimbiosis, apareció una compleja maquinaria basada en péptidos de tránsito, para enviar proteínas codificadas en el núcleo desde el citosol al orgánulo [Ball *et al.*, 2011]. Deusch y colaboradores [2008], tras el análisis genético de varios eucariotas fotosintéticos (*Arabidopsis*, *Oryza sativa*, *Chlamydomonas*, *Cyanidioschyzon*, etc.) concluyeron que, al menos, alrededor del 14 % de las proteínas codificadas en el núcleo de las plantas provienen de cianobacterias similares a *Nostoc* PCC 7120 o *Anabaena variabilis* ATC29143.



**Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las cianobacterias.** Los 126 genomas secuenciados hasta la fecha están presentes en el árbol, que fue generado tomando como referencia 31 secuencias proteicas comunes. Las ramas presentan el color de la sub-sección morfológica al que pertenecen: Unicelulares (Negro); Pleurocapsales (Naranja); Filamentosas (Verde); Formadoras de heterocistos (Rosa); Ramificadas (Morado). Las transiciones morfológicas se representan con triángulos azules. Imagen modificada de Shih y colaboradores [2013].

Las cianobacterias se caracterizan por ser, desde un punto de vista metabólico, muy homogéneas, siendo en su mayor parte autótrofas estrictas, aunque hay algunas especies que crecen mixotróficamente (utilizando azúcares como fuente de carbono y energía a la vez que realizan la fotosíntesis), fotoheterotróficamente (utilizando sustratos orgánicos como fuente de poder reductor al tener inhibida la fotosíntesis no cíclica) o heterotróficamente (utilizando sustratos orgánicos en ausencia de luz) [Rippka *et al.*, 1979]. No obstante, la fotosíntesis es el proceso principal para la generación del ATP y poder reductor necesarios para asimilar las formas inorgánicas del carbono, nitrógeno, azufre y los demás bioelementos.

La fijación de dióxido de carbono la llevan a cabo mediante el Ciclo de Calvin. Como peculiaridad en el metabolismo del carbono, las cianobacterias poseen un Ciclo de Krebs incompleto, debido a la carencia de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, quedando este ciclo como una ruta de función anabólica que proporciona 2-oxoglutarato: la molécula de carbono sobre la que se realiza la fijación de nitrógeno. Debido a la baja concentración disponible del dióxido de carbono, las cianobacterias han desarrollado unos microcompartimentos celulares donde se confina la RuBisCO, los carboxisomas, con el fin de mejorar la afinidad de esta enzima [Kaplan y Reinhold, 1999; Cameron *et al.*, 2014]. La degradación de azúcares se lleva a cabo mediante la ruta oxidativa de las pentosas fosfato [Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Smith, 1982]. Como fuente de nitrógeno las cianobacterias pueden utilizar nitrato, nitrito y amonio [Guerrero y Lara, 1987], aunque algunas estirpes pueden utilizar además urea, algunos aminoácidos o nitrógeno molecular atmosférico [Stewart, 1980; Flores y Herrero, 1994]. En este último caso, algunas estirpes han desarrollado células diferenciadas llamadas heterocistos, que aparecen en condiciones de ausencia de nitrógeno combinado. Es en estas células especializadas donde se realiza el proceso de fijación de dinitrógeno, para separarlo espacialmente de la fotosíntesis y evitar así la inactivación irreversible de la nitrogenasa por oxígeno molecular [Wolk, 1982]. Las cianobacterias capaces de incorporar nitrógeno molecular, pero que no desarrollan heterocistos, impiden la inactivación de la

nitrogenasa mediante el incremento del metabolismo respiratorio y la separación temporal de los procesos de fotosíntesis y fijación de nitrógeno [Fay, 1992].

A pesar de su homogeneidad metabólica, las cianobacterias son capaces de desarrollar procesos metabólicos muy variados, que a veces compiten entre sí dentro de la misma célula, como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas y, en algunos casos, la fijación de nitrógeno. Para ello, las cianobacterias presentan distintos sistemas de membranas que integran grandes complejos proteicos, mantienen gradientes de protones, participan en la división celular y desarrollan otras funciones esenciales para la viabilidad celular. La envoltura membranosas de las cianobacterias incluye una membrana externa, una membrana plasmática y un sistema de membranas tilacoidales. Además, entre las membranas externa y plasmática, en el llamado espacio periplásmico, se localiza una capa de peptidoglicano, por lo que las cianobacterias se clasifican dentro de las bacterias Gram negativas [Woese, 1987], si bien también poseen algunas características similares a la pared celular de las bacterias Gram positivas [Jurgens *et al.*, 1983]. No obstante, otros estudios [Hoiczky y Hansel, 2000] presentan a las cianobacterias como un grupo taxonómico bien diferenciado del resto de eubacterias y evolutivamente a medio camino entre las Gram positivas (grupo más ancestral) y las Gram negativas o proteobacterias (grupo más evolucionado). La membrana externa presenta una batería de porinas y proteínas transportadoras responsables de la selección de materiales a incorporar al interior celular; cabe destacar el papel de esta membrana en la captación y transporte activo de manganeso al espacio periplásmico [Keren *et al.*, 2002], elemento esencial en el funcionamiento del fotosistema (PS) II y fundamental como micronutriente. En la membrana plasmática, además de porinas y proteínas transportadoras (como transportadores de bicarbonato y distintas formas de fuentes inorgánicas de nitrógeno), se localizan varios complejos proteicos que intervienen en los procesos fotosintético y respiratorio, como componentes de la ATP sintasa y de los PS I y II; estos complejos son funcionales en las membranas tilacoidales,

pero parecen localizarse de manera transitoria en la membrana plasmática durante el proceso de biosíntesis y ensamblaje de las subunidades [Kaneko *et al.*, 2001; Keren *et al.*, 2005]. En cuanto a las membranas tilacoidales, estas están constituidas por una bicapa que genera en su interior un espacio, el lumen tilacoidal, donde se acumula el gradiente de protones generado en el proceso fotosintético. En la cara externa (plasmática) de la membrana tilacoidal se localizan, asociados al PS II, los ficobilisomas como pigmentos antena. En estas membranas tilacoidales, las cadenas de transporte de electrones de los procesos fotosintético y respiratorio comparten algunos elementos, como el complejo de citocromos (Cit)  $b_6-f$ , la plastoquinona (PQ) y los donadores de electrones alternativos Cit  $c_6$  y plastocianina (Pc), con lo que incluso los electrones que están siendo transportados en la cadena respiratoria pueden pasar a la cadena fotosintética y viceversa [Scherer, 1990].

La disposición de las membranas tilacoidales en el interior celular, y de los complejos proteicos en zonas específicas de estas membranas, es actualmente objeto de estudio y no parece ser igual en todas las cianobacterias. Así, algunos estudios apoyan la continuidad de las membranas plasmática y tilacoidales [Van de Meene *et al.*, 2006], mientras que otros autores han encontrado evidencias que caracterizan estos sistemas de membranas como compartimentos independientes [Keren *et al.*, 2005].

Respecto a sus características genéticas, la mayoría de cianobacterias estudiadas son poliploides, presentando un alto número de copias cromosómicas (en torno a 12) por célula. Muchas cianobacterias pueden incorporar DNA exógeno a su genoma de manera estable, por medio de un sistema de conjugación y recombinación homóloga [Porter, 1986; Ochman *et al.*, 2000]. Todo ello hace de las cianobacterias organismos ideales para el estudio molecular de los procesos fotosintéticos, respiratorios y metabólicos en general.

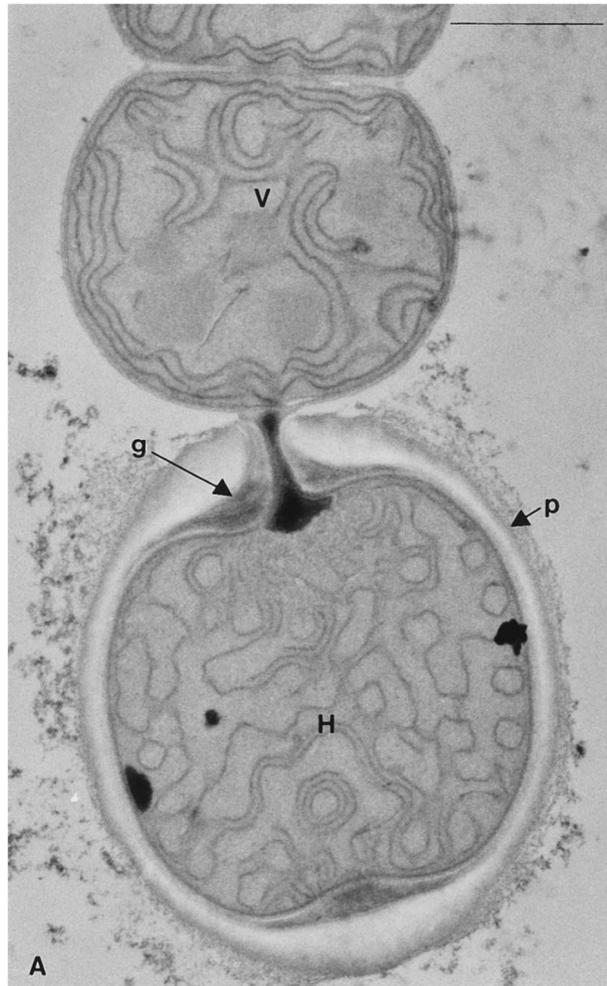
### 1.1.1. Heterocistos

Los heterocistos son células especializadas que han sufrido una diferenciación celular real y que poseen diferentes cualidades, tanto funcionales como estructurales, respecto a las células vegetativas, que constituyen la unidad de crecimiento del filamento (Figura 2). Estas células, que pierden la capacidad de división durante su desarrollo, son las encargadas de albergar el sistema de fijación de nitrógeno atmosférico, creando en su interior un ambiente libre de oxígeno para el correcto funcionamiento del sistema y, por lo tanto, perdiendo actividad fotosintética [Haselkorn, 1978; Wolk *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 2004]. Por ello, el papel que juega el heterocisto en el metabolismo de la cianobacteria en déficit de nitrógeno, o diazotrofía, es el de proporcionar a las células vegetativas adyacentes nitrógeno combinado en forma de glutamina, obteniendo de éstas glutamato y compuestos derivados de la fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  [Wolk *et al.*, 1976, 1994].

Para evitar la entrada de oxígeno en la célula, el heterocisto desarrolla una gruesa capa externa a la pared celular, formada por polisacáridos [Murray y Wolk, 1989]. A su vez, para evitar que haya difusión de oxígeno a través de las células adyacentes, el contacto entre los dos tipos celulares se reduce al mínimo, produciéndose una serie de septos muy estrechos que forman canales [Lang y Fay, 1971; Giddings y Staehelin, 1978, 1981].

Otra diferencia estructural presente en heterocistos es la reorganización de las membranas tilacoidales. La distribución periférica y con invaginaciones presente en las células vegetativas da lugar en los heterocistos a un sistema de membranas muy reticulado y polarizado en los septos, constituyendo los denominados “*honeycomb*”, o estructuras en panal [Lang y Fay, 1971], donde se concentra una gran cantidad de complejos respiratorios claves para mantener el ambiente libre de oxígeno y proporcionar el ATP necesario para el funcionamiento del complejo de fijación de nitrógeno [Murray *et al.*, 1981; Fay 1992]. Por ello, la elevada actividad respiratoria del organismo en condiciones

diazotróficas es debida casi exclusivamente a la actividad de las oxidasas respiratorias terminales de los heterocistos [Murray y Wolk, 1989].



**Figura 2. Micrografía de transmisión electrónica de *Nostoc* sp. PCC 7120.** Se muestran una célula vegetativa (V) y un heterocisto (H). La membrana tilacoidal de la célula vegetativa se encuentra estratificada de forma ordenada, mientras que en el heterocisto dicha membrana esta menos ordenada. La capa de polisacáridos (p) y la de glicolípidos (g) son visibles alrededor del heterocisto. La barra negra (arriba a la derecha) indica 1  $\mu\text{m}$ . Extraído de Magnuson y colaboradores [2016].

La cianobacteria en la que se ha centrado este trabajo es *Nostoc* sp. PCC 7119, una cianobacteria filamentosa perteneciente a la sección IV que es capaz de desarrollar heterocistos.

## 1.2. Las cadena fotosintética y respiratoria en cianobacterias

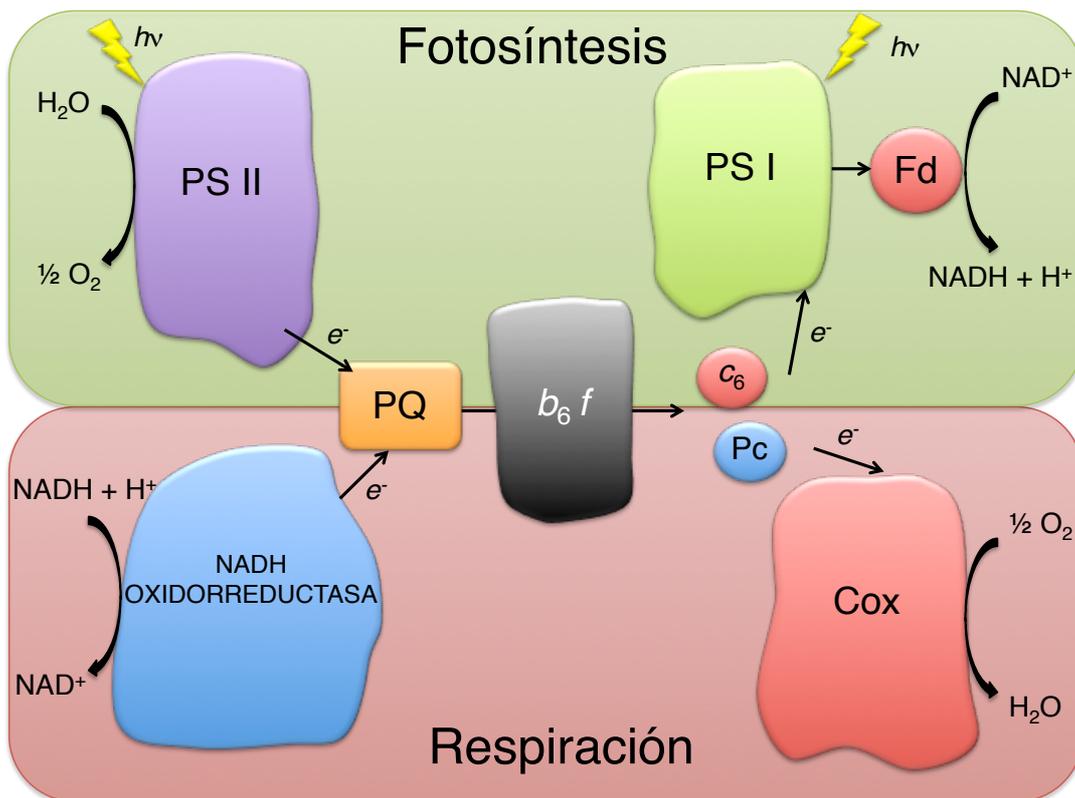
La fotosíntesis es el proceso bioenergético principal de las cianobacterias, siendo en muchos casos la única fuente de entrada de energía, como ocurre en muchas cianobacterias fotoautótrofas estrictas, donde la respiración celular es casi inexistente. Como ya hemos comentado, las cianobacterias son el único grupo de procariotas capaz de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la de algas eucariotas o plantas [Blankenship, 1992].

Una característica esencial para entender la enorme versatilidad de las cianobacterias es el hecho de que en estos organismos procariotas las cadenas de transporte fotosintética y respiratoria están unidas espacialmente y comparten una serie de elementos comunes, como son la PQ, la Pc, el Cit  $c_6$  y el complejo Cit  $b_6-f$  (Figura 3) [Paumann *et al.*, 2005]. Sin embargo, se produce una cierta espacialidad en los procesos: en la membrana tilacoidal, se localizan ambas rutas bioenergéticas de forma intercalada, mientras que en la membrana citoplasmática sólo aparece una cadena respiratoria alternativa [Schmetterer, 1994]. A pesar de la existencia de dos sistemas respiratorios independientes, está establecido que la respiración en cianobacterias se inhibe en presencia de luz, por lo que la separación no es sólo espacial, sino también temporal [Brown y Webster, 1953].

### 1.2.1. La cadena fotosintética

La cadena fotosintética está constituida por tres grandes complejos de membrana: el PS II, el complejo Cit  $b_6-f$  y el PS I, e interconectando estos complejos encontramos transportadores de electrones móviles. El transportador de electrones entre el PS II y el complejo Cit  $b_6-f$  es la PQ, una pequeña molécula liposoluble que puede moverse a través de la membrana [Swiezewska, 2004], mientras que los mediadores entre el complejo Cit  $b_6-f$  y el PS I son el Cit  $c_6$  y la Pc, dos pequeñas metaloproteínas hidrosolubles situadas

en el lumen tilacoidal [Hope, 2000; Fromme *et al.*, 2003]. El flujo de electrones a través del complejo Cit  $b_6-f$  conlleva, a su vez, un trasiego de protones hacia el interior del lumen tilacoidal, generando un gradiente que puede ser empleado por las ATPasas para generar energía [Mitchell, 1961]. En última instancia, el PS I cede los electrones a la ferredoxina (Fd), o a la flavodoxina (Fld) en condiciones de déficit de hierro, que los transfieren a la Fd-NADP<sup>+</sup> reductasa, y esta a su vez los cede al NADP<sup>+</sup>, dando lugar a NADPH. Al flujo de electrones desde el PS II hasta el NADP<sup>+</sup> se denomina flujo lineal o no cíclico. Se llama así para diferenciarlo del llamado flujo cíclico, en el que la Fd, en vez de generar poder reductor, reduce a la PQ a través de una Fd-quinol reductasa, sin implicar al PS II, permitiendo generar un gradiente protón-motriz y producir ATP sin síntesis de NADPH [Bendall y Manasse, 1995].



**Figura 3. Esquema de las cadenas de electrones fotosintética y respiratoria en cianobacterias.** El complejo Cit  $b_6-f$  y los transportadores redox PQ, Pc y Cit  $c_6$  son comunes en fotosíntesis y respiración. Fotosistema II (PS II); plastocianina (Pc); citocromo  $c_6$  ( $c_6$ ); fotosistema I (PS I); ferredoxina (Fd); citocromo  $c$  oxidasa (Cox).

En el caso de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, durante la diferenciación de estas células especializadas se produce un reajuste importante del aparato fotosintético de la célula. De esta forma se pierde por completo el PS II, debido a que su actividad provocaría una liberación de  $O_2$  intracelular que inhibiría la actividad de la nitrogenasa [Donze *et al.*, 1972; Fay, 1992; Wolk *et al.*, 1994]. De hecho, no sólo se pierde este complejo, sino que además se observa una importante disminución de pigmentos fotosintéticos con respecto a las células vegetativas. Pese a esto, el heterocisto es capaz de realizar fotosíntesis cíclica, generando ATP para mantener la actividad nitrogenasa.

### 1.2.2. La cadena respiratoria

En la cadena respiratoria principal de cianobacterias, que está situada en la membrana tilacoidal, se encuentran tres macrocomplejos embebidos en la membrana: la NADH deshidrogenasa, de nuevo el complejo Cit  $b_6-f$  y la citocromo  $c$  oxidasa (Cox), u oxidasa terminal, encargada de transferir los electrones al oxígeno. Así, los electrones generados a partir de la oxidación del NADH en el complejo NADH deshidrogenasa, son transportados por la PQ (al igual que en la cadena fotosintética) al complejo Cit  $b_6-f$  [Schmetterer, 1994]. Posteriormente, los electrones pasarán al Cit  $c_6$  o la Pc para, finalmente, llegar a la Cox y, en última instancia, al oxígeno [Lockau, 1981]. Existe, además, una cadena respiratoria alternativa situada en la membrana citoplásmica que implicaría algún tipo de oxidasa respiratoria terminal diferente a la oxidasa presente en las membranas tilacoidales de la cianobacteria [Schmetterer, 1994].

En *Nostoc* sp. PCC 7119 se encuentran tres operones que codifican para oxidasas terminales, los denominados genes *cox*. El primero de ellos, el operón *cox1*, codifica para una oxidasa terminal exclusiva de células vegetativas, mientras que los operones *cox2* y *cox3* codifican para oxidasas específicas de

heterocistos [Jones y Haselkorn, 2002; Valladares *et al.*, 2003]. Por lo tanto, se piensa que *cox2* y *cox3* contribuyen a la protección de la nitrogenasa, jugando *cox3* un papel esencial en dicha protección [Valladares *et al.*, 2007]. Se cree que la actividad respiratoria de estas oxidasas se concentra en los *honeycombs*, ya que la ausencia de dichas oxidasas provoca la desorganización de estas estructuras [Valladares *et al.*, 2007].

La redundancia en la aparición de oxidasas terminales y el hecho de que hay pocos estudios que aborden la funcionalidad de Cit  $c_6$  y Pc con estas oxidasas complica el desarrollo de un modelo de transferencia electrónica que explique como ocurre la respiración en cianobacterias.

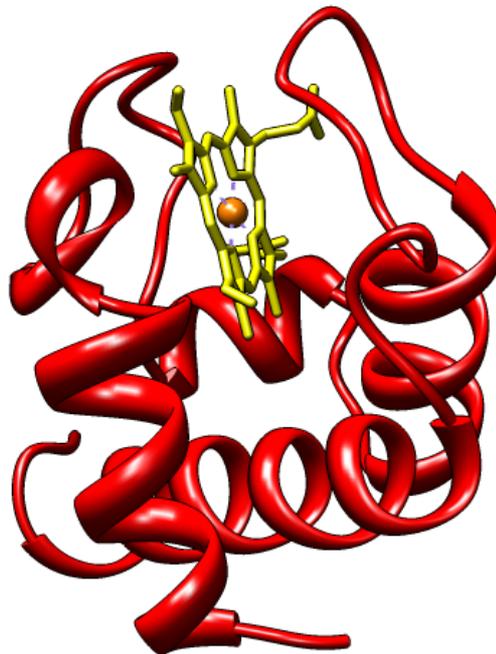
### 1.3. Citocromo $c_6$ y plastocianina

#### 1.3.1. Citocromo $c_6$

El Cit  $c_6$  es un transportador soluble de electrones encargado de transferir electrones desde el complejo Cit  $b_6-f$  (a través del Cit  $f$ ) al PS I, en la fotosíntesis oxigénica. Está presente en todas las cianobacterias conocidas y en una gran cantidad de algas [Schmetterer, 1994; Ki, 2005]. Sin embargo, a lo largo de la evolución, ha sido sustituido en plantas por la Pc, aunque en cianobacterias y algas verdes ambas proteínas se pueden encontrar en el mismo organismo, sustituyendo el Cit  $c_6$  a la Pc en condiciones de deficiencia de cobre [Davis *et al.*, 1980; Sandmann, 1985].

Cuando el Cit  $c_6$  y Pc aparecen en el mismo organismo, la expresión de uno u otro está fuertemente regulada en el inicio de transcripción por cobre [Bovy *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994]. Existen excepciones, como *Chlamydomonas reinhardtii*, donde la expresión del Cit  $c_6$  esta inhibida por cobre mientras que la expresión de la Pc es constitutiva. En este organismo, en deficiencia de cobre, se sintetiza la preapo-Pc pero esta se

degrada rápidamente mediante ubiquitinación [Hill y Merchant, 1992; Merchant *et al.*, 1991].



**Figura 4. Modelo tridimensional del citocromo  $c_6$  de *Nostoc* sp. PCC 7120.** Su secuencia [código PDB 4GYD, Díaz-Moreno *et al.*, 2014] es idéntica a la de *Nostoc* sp. PCC 7119. En amarillo se señala el grupo hemo y en naranja el átomo de hierro.

El Cit  $c_6$  es un Cit de tipo *c* de clase I con un grupo hemo unido covalentemente a la cadena polipeptídica por la secuencia consenso Cys-X-X-Cys-His [Campos *et al.*, 1993], siendo Cys-Ala-Ser-Cys-His en *Nostoc* sp. PCC 7119. Se trata de una hemoproteína soluble de unos 10 kDa, con un potencial rédox a pH 7 de +335 mV y un pico máximo de absorbancia a 553 nm, que corresponde a la denominada banda  $\alpha$  [Cohn *et al.*, 1989; Moore y Pettigrew, 1990; Campos *et al.*, 1993]. Este Cit se codifica por el gen *petJ* y se sintetiza en el citoplasma en forma de preapocitocromo. Posteriormente se transloca al lumen tilacoidal dirigido por un péptido de tránsito conservado en el extremo N-terminal. En el lumen tilacoidal se madura, se elimina el péptido de tránsito y se produce la unión covalente del grupo hemo [Merchant *et al.*, 1987; Bovy *et al.*, 1992; Howe *et al.*, 1994]. En la secuencia aminoacídica se encuentran tres regiones

altamente conservadas. Las regiones comprendidas entre los residuos 9 al 21 y entre los residuos 56 al 65 contienen los dos ligandos axiales del grupo hemo: la His18 y la Met58. El otro área conservada que engloba los residuos del 68 al 71 se encuentra altamente conservada en organismos eucariotas, pero no en cianobacterias [Cohn *et al.*, 1989; Kerfeld *et al.*, 1995]. La estructura secundaria del Cit  $c_6$  consiste en cuatro hélices  $\alpha$  conectadas entre sí por tres lazos (Figura 4) [Frazão *et al.*, 1995; Beissinger *et al.*, 1998]. El grupo hemo se localiza en un bolsillo hidrófobo rodeado por 23 aminoácidos, de los cuales 13 están altamente conservados. Hay, además, cuatro residuos aromáticos conservados (Phe10, Phe61, Tyr76 y Trp85) expuestos al solvente en la superficie de la proteína. De hecho, sólo el 6 % del grupo hemo está expuesto al solvente, concretamente los átomos de los pirroles C y D [Frazão *et al.*, 1995]. Respecto al potencial electrostático de superficie, este varía en función del organismo, pudiendo tener carga neta positiva, negativa o neutra. En *Nostoc* encontramos en la superficie de la molécula una zona básica, con carga neta positiva, que sería clave para la interacción, tanto con el complejo Cit  $f$  como con el PS I [Molina-Heredia *et al.*, 1999]. Cercano a esta región se encuentra un residuo estrictamente conservado que es clave para la transferencia de electrones al PS I: la Arg64 [Molina-Heredia *et al.*, 1999, 2001].

### 1.3.2. Plastocianina

La Pc es una cuproproteína soluble, con un peso molecular de 10,5 kDa y un potencial rédox a pH 7 de +370 mV, que contiene un único átomo de cobre unido a una cadena polipeptídica de 100 aminoácidos [Redinbo *et al.*, 1994]. La naturaleza y estructura de los ligandos del cobre son la causa del color azul que presenta la proteína oxidada, típico de cuproproteínas de tipo I, con un máximo de absorbancia cercano a 600 nm, debido a la transferencia de carga que se produce por el corto enlace (Cys89)S-Cu entre el ligando y el átomo de cobre, como consecuencia del solapamiento de sus orbitales [Sigfridsson, 1998]. Su estructura secundaria está muy conservada y se compone de ocho

cadena conectadas por siete lazos. Siete de esas cadenas tienen una configuración en lámina- $\beta$ , mientras que la restante suele tener una conformación en  $\alpha$ -hélice corta, formando un cilindro aplanado o barril- $\beta$  con el átomo de cobre en el denominado extremo norte de la molécula (Figura 5) [Guss *et al.*, 1986].



**Figura 5. Modelo tridimensional de la plastocianina de *Anabaena variabilis*.** Su secuencia [código PDB [2CJ3](#)] es idéntica a la de *Nostoc* sp. PCC 7119. En celeste se presenta el átomo de cobre.

El gen que codifica para la Pc es el *petE* y la proteína se sintetiza en el citoplasma, como un precursor con un péptido de tránsito, al igual que el Cit  $c_6$ . La preapoplastocianina se transporta al lumen tilacoidal, donde se escinde el péptido de tránsito y se une el átomo de cobre [Merchant *et al.*, 1990; Van der Plas *et al.*, 1989].

Los residuos conservados incluyen los cuatro ligandos del átomo de cobre (His39, His92, Cys89 y Met97), así como la Tyr88, entre otros. A pesar del alto grado de conservación de la estructura secundaria, hay una alta variación en el

potencial electrostático de superficie entre distintas Pc, siendo ácida en eucariotas, neutra en algunas cianobacterias como *Synechocystis* y básica en otras cianobacterias, como *Nostoc* sp. PCC 7119 [Sykes, 1985; Medina *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1994].

El átomo de cobre se localiza en un bolsillo formado por residuos hidrófobos altamente conservados y no se encuentra expuesto al solvente (al contrario que ocurre con el grupo hemo del Cit  $c_6$ ). El átomo de cobre está coordinado por 2 átomos de nitrógeno de los anillos de imidazol de los residuos His39 y His92 y por los dos átomos de azufre de los residuos Cys89 y Met97. En este caso, el único ligando expuesto al solvente es la His92 [Guss y Freeman, 1983; Redinbo *et al.*, 1994]. La geometría del sitio activo, en forma de tetraedro distorsionado [Guss y Freeman, 1983], explica el alto valor de potencial rédox que presenta la Pc.

La región plana de la proteína que rodea a la His92 se conoce como zona hidrófoba, extremo norte o sitio 1. En los organismos eucariotas, esta región incluye los residuos Leu12, Ala33, Gly34, Phe35, Pro36, Pro86, Gly89 y Ala90 [Guss *et al.*, 1992; Redinbo *et al.*, 1994], aunque en cianobacterias se pueden encontrar otros residuos distintos en las posiciones 33 a 35. Los resultados de experimentos de modificación química y mutagénesis dirigida, así como la resolución de las estructuras, han llevado a la conclusión de que la región hidrófoba es el sitio por el cual se produce la transferencia de electrones desde el Cit  $f$  y al PS I [Anderson *et al.*, 1987; Nordling *et al.*, 1991; Haehnel *et al.*, 1994; Sigfridsson *et al.*, 1996; De la Cerda *et al.*, 1997; Molina-Heredia *et al.*, 2001; Ubbink, 2004; Díaz-Moreno *et al.*, 2005a; Albarrán *et al.*, 2005]. El anillo imidazol de la His92 expuesto al solvente representa la distancia más corta desde el átomo de cobre a la superficie (6 Å) y muy probablemente constituye el camino de los electrones desde el Cit  $f$  hacia el dímero de clorofila fotooxidado P700<sup>+</sup>. La Tyr88 está expuesta al solvente y, en plantas, se encuentra rodeada de residuos con carga negativa en las posiciones 42 a 45 y 59 a 61 [Sykes, 1985; Guss *et al.*, 1986; Redinbo *et al.*, 1994]. Estas dos

regiones ácidas forman la cara este, zona negativa o sitio 2 de la Pc de plantas, la única región de superficie con concentración de cargas [Durell *et al.*, 1990]. En eucariotas, la interacción de la Pc con el Cit  $f$  es fundamentalmente de tipo electrostático [Qin y Kostic, 1992; Meyer *et al.*, 1993]. Tanto experimentos cinéticos *in vitro* como la determinación de la estructura del complejo Pc/Cit  $f$  mediante medidas de desplazamiento químico por NMR, han establecido que en la interacción entre estas dos proteínas intervienen tanto la región negativa de la cara este de la Pc como residuos de lisina y arginina del Cit  $f$  [Takabe *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1987; Adam y Malkin, 1989; He *et al.*, 1991; Modi *et al.*, 1992; Betts *et al.*, 1992; Ubbink, 2004; Díaz-Moreno *et al.*, 2005a; Albarrán *et al.*, 2005]. También, se ha propuesto que la cara este de la Pc interviene en la unión con el PS I, ya que mutaciones en esta zona inducen cambios en la tasa de reducción del PS I [Sigfridsson *et al.*, 1996; De la Cerda *et al.*, 1997; Molina-Heredia *et al.*, 2001]. De todos estos datos se puede inferir que tanto la zona hidrófoba como la cara este intervienen en la unión con el PS I y el Cit  $f$ . En ambos casos, la transferencia de electrones tendría lugar por la His92. Así mismo, como ocurre con el Cit  $c_6$ , la Pc de *Nostoc* contiene un residuo de arginina clave para la interacción eficiente con el PS I, la Arg88 [Molina-Heredia *et al.*, 1999, 2001].

#### 1.4. Citocromos alternativos

Como ya hemos mencionado previamente, en todos los genomas de cianobacterias estudiados se ha encontrado, al menos, una copia del gen *petJ*, que codifica para el Cit  $c_6$ . Sin embargo, un gran número de cianobacterias presentan, además, una isoforma de este gen, el denominado Cit  $c_{6-2}$  [Ki 2005; Reyes-Sosa *et al.*, 2011]. En plantas, es común encontrar una segunda isoforma funcional de la Pc, que jugaría el mismo papel con una eficiencia similar [Abdel-Ghany, 2009]. Por ello, la aparición de una o varias isoformas de una proteína crucial en fotosíntesis y respiración puede ser explicada desde diferentes ángulos. Puede ser que se traten de ortólogos, como el caso de la

Pc en plantas superiores, pero también podrían tratarse de parálogos, proteínas que han evolucionado desde un ancestro común y que pueden llevar a cabo funciones distintas. De hecho, la presencia de isogenes abre la puerta a la posibilidad de que cada uno pueda desarrollar una función metabólica en un escenario concreto.

En *Nostoc* sp. PCC 7119 aparece una isoforma del Cit  $c_6$ , el Cit  $c_{6-2}$  [Reyes-Sosa *et al.*, 2011], además de un homólogo del Cit  $c_M$ , estudiado únicamente en *Synechocystis* [Malakhov *et al.*, 1999]. Finalmente, a lo largo del trabajo realizado en esta tesis doctoral, se ha encontrado una segunda isoforma del Cit  $c_6$ , a la que se ha denominado Cit  $c_{6-3}$  [Torrado *et al.*, 2016].

#### 1.4.1. Citocromo $c_{6-2}$

El Cit  $c_{6-2}$  es un Cit  $c$  de clase I, soluble, presente en multitud de cianobacterias [Ki, 2005]. Se trata de un citocromo con un grado de identidad y de homología con el Cit  $c_6$  en la zona hidrófoba de un 50 % y 100 %, respectivamente. A su vez, el grado de identidad y homología con el Cit  $c_6$  en la zona electrostática es de un 62 % [Reyes-Sosa *et al.*, 2011]. Bialek y colaboradores [2008] subdividieron provisionalmente este grupo de citocromos en dos subgrupos: Cit  $c_{6B}$  y Cit  $c_{6C}$ , para diferenciarlos del Cit  $c_{6A}$  encontrado en plantas y en algunas algas verdes; pero, a fecha de hoy esta subclasificación carece de sentido desde un punto de vista funcional. Por ejemplo, se ha encontrado una divergencia filogenética aún mayor entre los Cit  $c_6$  de cianobacterias y de algas verdes [De la Rosa *et al.*, 2006] y no por eso se han subclasificado en dos clados distintos. Polémicas aparte, el Cit  $c_{6-2}$  se clasificaría dentro del grupo de los denominados Cit  $c_{6C}$ .

El Cit  $c_{6-2}$  posee un residuo estrictamente conservado de tirosina en la posición 61 (en *Nostoc* sp. PCC 7119), que no está conservado en los Cit  $c_6$ . Su espectro de absorción es muy similar al del Cit  $c_6$ , con un máximo de

absorción de la banda  $\alpha$  a 553 nm. A diferencia del Cit  $c_6$ , el motivo de unión del grupo hemo es Cys-Arg-Gly-Cys-His, y a nivel de potencial electrostático de superficie posee una zona hidrófoba muy conservada, mientras que la superficie de interacción a larga distancia no lo está, siendo esta muy negativa. La localización teórica sería el lumen tilacoidal, ya que contiene un péptido de tránsito similar al del Cit  $c_6$ , aunque no ha sido determinada experimentalmente [Reyes-Sosa *et al.* 2011]. El Cit  $c_{6-2}$  es capaz de interaccionar con el PS I y reducirlo, aunque de forma menos eficiente que el Cit  $c_6$  o la Pc. Así mismo, esta proteína presenta en *Nostoc* un potencial rédox a pH 7 de +200 mV, lo cual hace complicado que obtenga electrones del complejo Cit  $b_6-f$ . En cambio, con dicho potencial rédox la transferencia de electrones al PS I o al Cit  $b_6-f$  estaría favorecida [Reyes-Sosa *et al.* 2011].

#### 1.4.2. Citocromo $c_M$

El Cit  $c_M$  es un Cit  $c$  soluble de clase I que se encuentra en todas las cianobacterias cuyos genomas se han secuenciado [Malakhov *et al.*, 1994; Ki 2005; Hiraide *et al.*, 2014]; sin embargo, su función es desconocida. Se conoce muy poco de este Cit y sólo se han realizado algunos estudios en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Malakhov *et al.*, 1994; Manna y Vermaas, 1997; Molina-Heredia *et al.*, 2002; Bernroitner *et al.*, 2009; Hiraide *et al.*, 2014]. En estos trabajos se ha demostrado que la expresión del gen, a nivel de RNAm, es muy baja y que los mutantes de delección del gen pueden crecer con normalidad bajo condiciones fotótrofas [Malakhov *et al.*, 1994; Manna y Vermaas, 1997]. Sin embargo se observa que, bajo condiciones de estrés por baja temperatura y alta intensidad lumínica, condiciones en las que se reprime la expresión del Cit  $c_6$  y la Pc, se produce un gran aumento en la expresión del Cit  $c_M$ . Por ello se piensa que la función del Cit  $c_M$  puede estar relacionada con la fotoprotección o con la protección frente a estrés oxidativo [Malakhov *et al.*, 1999]. El Cit  $c_M$  también posee un péptido de tránsito similar al del Cit  $c_6$  o Cit  $c_{6-2}$ , por lo que se piensa que se localizaría en el lumen tilacoidal

[Molina-Heredia *et al.*, 2002]. Metzger y colaboradores [1995] sugirieron un papel fotosintético para esta proteína, ya que al deletar simultáneamente la Pc y el Cit  $c_6$  en *Synechocystis* encontraron que seguía habiendo actividad fotosintética. Sin embargo, estudios de interacción del Cit  $c_M$  con el PS I en *Synechocystis* sp. PCC 6803 descartaron esta posibilidad [Molina-Heredia *et al.*, 2002]. Además, el potencial redox a pH 7 del Cit  $c_M$ , de +150 mV, hace que esta proteína sea incapaz de captar electrones del complejo Cit  $b_6-f$  [Molina-Heredia *et al.*, 2002]. Manna y Vermaas [1997] sugirieron, por otra parte, que el Cit  $c_M$  podría estar involucrado en respiración, basándose en que un doble mutante de delección Cit  $c_6$  / Cit  $c_M$  no era viable. Posteriormente, Bernroitner y colaboradores [2009] apoyaron esta hipótesis del posible papel del Cit  $c_M$  en respiración. Se basaron en los estudios de Malakhov y colaboradores [1999] que ya hemos comentado, y en estudios de localización de la proteína, en los que sugerían que esta se podría colocalizar con las oxidasas respiratorias terminales en las membranas tilacoidales. Sin embargo, aún no se ha establecido de forma concluyente la localización subcelular del Cit  $c_M$  ni su posible función en la cadena respiratoria de transporte de electrones.

#### 1.4.3. Citocromo $c_{6A}$

El Cit  $c_{6A}$  es un Cit soluble de tipo *c* que se ha encontrado en algunas plantas superiores, como *Arabidopsis thaliana*, donde fue identificado por primera vez [Gupta *et al.*, 2002; Wastl *et al.*, 2002], y en algunas algas verdes [Wastl *et al.*, 2004], donde pueden coexistir con el Cit  $c_6$ . Wastl y colaboradores [2002] aportaron evidencias de la transcripción de este gen en *A. thaliana*, así como en otras plantas superiores o algas verdes [Wastl *et al.*, 2004; Worrall *et al.*, 2008]. Gupta y colaboradores [2002] describieron unos experimentos con mutantes *knock-out* de la Pc y del Cit  $c_{6A}$  de *A. thaliana* en los que se observaba que los mutantes simples eran viables mientras que no era posible generar el mutante doble. Estos mismos investigadores también sugirieron que en *A. thaliana* el Cit  $c_{6A}$  podía reemplazar funcionalmente a la Pc en

experimentos de reconstitución *in vivo* empleando membranas tilacoidales en ensayos de evolución de oxígeno. Tras estos resultados, postularon que el Cit  $c_{6A}$  era el análogo funcional de la Pc en plantas superiores. Sin embargo, Weigel y colaboradores [2003] mostraron que si se inactivan los dos genes de Pc presentes en *Arabidopsis* mientras que se sobreexpresa el Cit  $c_{6A}$ , las plantas resultantes no eran capaces de crecer fotoautótrofamente. Simultáneamente Molina-Heredia y colaboradores [2003], mediante ensayos de cinéticas rápidas inducidas por láser *in vitro*, demostraron que el Cit  $c_{6A}$  era incapaz de interactuar eficientemente con el PS I. Además, determinaron que el potencial rédox a pH 7 del Cit  $c_{6A}$  era de +150 mV, alrededor de 200 mV inferior al de la Pc o del Cit  $f$ , por lo que, desde un punto de vista termodinámico, no sería capaz de aceptar electrones desde el Cit  $f$ . De esta forma se descartó fehacientemente la hipótesis de que el Cit  $c_{6A}$  pudiese sustituir funcionalmente a la Pc en plantas. En este contexto, aunque algunos autores han postulado una posible función regulatoria [Wastl *et al.*, 2002; Molina-Heredia *et al.* 2003; Weigel *et al.*, 2003; Worrall *et al.*, 2008], hasta la fecha no se conoce cuál puede ser la función del Cit  $c_{6A}$ . Finalmente, debido a que filogenéticamente se encuentra muy alejado del Cit  $c_6$  y a que su potencial rédox es demasiado bajo como para incluirlo en dicho grupo, hay autores que, en vez de asociarlo evolutivamente con el Cit  $c_6$  lo asocian al Cit  $c_M$  [De la Rosa *et al.*, 2006] o al Cit  $c_{6-2}$  [Zatwarnicki *et al.*, 2014].



**OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

En todas las cianobacterias estudiadas, como ya hemos comentado, aparece el Cit  $c_6$ , cuya función respiratoria y fotosintética está bien caracterizada. Así mismo, en un gran número de cianobacterias aparecen isoformas de este Cit cuya función no está definida, como el Cit  $c_M$ , que se ha postulado como Cit respiratorio, o el Cit  $c_{6-2}$ , que podría actuar en fotosíntesis. El Cit  $c_6$  está involucrado en fotosíntesis, respiración y en fotosíntesis anoxigénica. La presencia de varias isoformas dentro de una misma cianobacteria abre la posibilidad a que cada una de ellas juegue un papel funcional diferente. Por lo tanto, el objetivo fundamental de esta tesis ha sido el estudio de las diferentes isoformas del Cit  $c_6$  que aparecen en la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Nostoc* sp. PCC 7119.







### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Organismos y condiciones de cultivo

##### 3.1.1. *Nostoc*

Para este estudio se empleó la estirpe *Nostoc* sp. PCC 7119 (ATCC 29151) [Adolph y Haselkorn, 1971; Rippka *et al.*, 1979].

Además, en esta tesis doctoral se han construido varias estirpes mutantes derivadas de *Nostoc* sp. PCC 7119 (de ahora en adelante *Nostoc*), cuyas características se describen en la Tabla 1:

**Tabla 1. Estirpes mutantes de *Nostoc* sp. PCC 7119 desarrolladas en este trabajo.**

Estirpe	Características	Resistencia a antibióticos
AT1	Fusión de GFP a la región promotora, más los tres primeros aminoácidos, del gen <i>petJ-3</i>	Sm, Sp
AT2	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ</i>	Sm, Sp
AT3	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ-2</i>	Sm, Sp
AT4	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ-3</i>	Sm, Sp
AT5	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>cytM</i>	Sm, Sp
AT6	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petE</i>	Sm, Sp
AT7	Gen <i>petJ-3</i> con una delección de 236 pb	Sm, Sp
AT8	Gen <i>petJ-2</i> con una delección de 250 pb	Sm, Sp
AT9	Gen <i>petJ-3</i> con 6 histidinas unidas al extremo C terminal	Sm, Sp

El medio de cultivo utilizado fue el denominado BG11 [Rippka *et al.*, 1979] cuya composición se describe en la Tabla 2.

Para los ensayos realizados en ausencia de cobre, no se añadió  $\text{CuSO}_4$  y, para asegurar una total ausencia de cobre, se suplementó con 300  $\mu\text{g/ml}$  del quelante de cobre BCSA (Batocuproína disulfonato sódico). Para los cultivos en

ausencia de nitrógeno combinado (BG11<sub>0</sub>) no se añadió NaNO<sub>3</sub>. La esterilización de los medios se llevó a cabo en un autoclave, a 1 atm de sobrepresión (121 °C), durante 20 min.

**Tabla 2. Medio de cultivo BG11 para cianobacterias.**

Componentes del medio BG11 según Rippka y colaboradores [1979].

Compuesto	Concentración final (mg/l)
NaNO <sub>3</sub>	150
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	40
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	75
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	36
Ácido Cítrico	6
Citrato Amónico-Férrico	6
EDTA	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20
H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2,860
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,810
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,222
NaMoO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,390
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,049

Los cultivos en medio líquido se realizaron en frascos de Roux de 1 l, situados en cámaras termostalizadas a 30 °C y con una iluminación continua de 75  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Los cultivos se realizaron en presencia de 10 mM de NaHCO<sub>3</sub> y se burbujearon con aire suplementado con un 1 % (v/v) de CO<sub>2</sub> (BG11C o BG11<sub>0</sub>C en caso de cultivos burbujeados con aire y sin fuente de nitrógeno combinado).

Para cultivos con agar en cajas de Petri, se añadió Bacto-Agar (Difco) al 1 % (p/v), esterilizado en autoclave separadamente de los nutrientes y mezclado con los mismos justo antes de verter el medio en las cajas. Los cultivos se incubaban a 30 °C con iluminación continua de 75  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ .

Cuando se requirió la adición de antibióticos para la selección de estirpes mutadas, estos se adicionaron a las siguientes concentraciones finales: estreptomicina (Sm) a 5  $\mu\text{g/ml}$ , espectinomicina (Sp) a 5  $\mu\text{g/ml}$  y neomicina (Nm) a 25  $\mu\text{g/ml}$ . Para la selección de dobles recombinantes, y como control de la integridad del gen *sacB*, los medios se suplementaron con sacarosa al 5 % (p/v). Los antibióticos y la sacarosa se esterilizaron por filtración con membranas de nitrocelulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Las células de *Nostoc* se recogieron por filtración, a temperatura ambiente, utilizando filtros de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Cuando, por razones experimentales, se requería transferir las células a un medio con una fuente de nitrógeno diferente, tras ser recogidas por filtración se lavaron dos veces con medio BG11<sub>0</sub>. Las células recogidas por filtración se lavaban en el filtro con 50-100 ml de medio.

Las células para la extracción de RNA se recogían mediante filtración, se lavaban en el mismo filtro con 4 ml de tampón TE y se transfirieron luego a tubos de microcentrífuga, donde se centrifugaron a 13 000 r.p.m. durante 1 min. Posteriormente se congeló el sedimento en nitrógeno líquido y se conservó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.1.2. *Escherichia coli***

Las estirpes de *Escherichia coli* que se utilizaron en este trabajo y sus genotipos se describen en la siguiente Tabla 3.

Como medio de cultivo habitual se utilizó el de Luria-Bertani (LB) [Green y Sambrook, 2012], cuya composición se describe en la Tabla 4.

Para preparar agar-LB se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 15 g/l. Para la producción de citocromos, el medio se suplementó con 6 mg/l de Citrato- $\text{NH}_4\text{-Fe}$ , mientras que para la producción de plastocianinas se

suplementó con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . La esterilización de los medios se llevó a cabo en un autoclave, a 1 atm de sobrepresión (121 °C), durante 20 min.

**Tabla 3. Estirpes de *E. Coli* utilizadas en este trabajo.**

Estirpe	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	$F'::\text{Tn10 } proA^+B^+, lacI^q \Delta(lacZ)M15/ ompT [lon] hsdS_B$ ( $r_B^-m_B^-$ , una <i>E. coli</i> B) con DE3, un profago de $\lambda$ que lleva el gen de la polimerasa de RNA del fago	Studier y Moffat, 1986
DH5 $\alpha$	$F^-, \phi80dlacZ \Delta M15, \Delta(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K^-, m_K^+), phoA, supE44, \lambda^-, thi-1, gyrA 96, relA 1$	Hanahan, 1983
ED8654	<i>Lac-3, LacY1, supE44, hsdR514(r_K^-m_K^+), recA56, mcrA1 metB1, lacY, galK2, galT22, trpR55</i>	Borck <i>et al.</i> , 1977
GM119	$F^-, fhuA2dam-3, dcm-6, metB1, galK2, galT22, lacY1, tsx78, supE44 (thi1 tomA31 mtl1)$	Marinus y Morris, 1973
HB101	$F^-, supE44, hsdS20 (r_B^-, m_B^-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi -1$	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_B^-, m_B^-), supE44, relA1, <math>\Delta(lac-proAB)</math> / <math>F'</math> [<i>traD 36, proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZ <math>\Delta M15</math></i>]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
MC1061	$F^-, araD139, \Delta(ara-leu)7696, galE15, galK16, \Delta(lac)X74, rpsL, (Str^r), hsdR2 (r_K^- m_K^+), mcrA, mcrB1$	Casadaban y Cohen, 1980

**Tabla 4. Medio de cultivo LB para *E. coli*.**

Componentes del medio LB según Green y Sambrook [2012].

Compuesto	Concentración (g/l)
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro Sódico	10

Los cultivos con agar se realizaron en cajas de Petri incubadas a 37 °C. En caso de utilizar plásmidos y estirpes de *E. coli* que permitiesen identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la interrupción del gen

*lacZ*, el medio se suplementó con 0,2  $\mu\text{M}$  de X-Gal y 16  $\mu\text{M}$  de IPTG. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco, frente al color azul de las que no lo portaban. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos y en matraces Erlenmeyer, con una capacidad total cinco veces mayor que el volumen del cultivo utilizado, y se incubaron a 37 °C, con agitación orbital continua de 200 r.p.m. durante 16 h. Las células se recogieron por centrifugación a 14 000  $\times g$  durante 5 min.

En los casos en los que se deseaba obtener grandes cantidades de proteínas recombinantes, los cultivos se realizaron en un reactor Biostat C (B. Braun Biotech) de 40 l de capacidad, cargado con 30 l de caldo de cultivo. Para la producción de las metaloproteínas, el medio se agitó a 200 r.p.m. y se aplicó un burbujeo constante de aire a un flujo de 4 l/min. El pH se mantuvo constante a pH 7,0, mediante adición controlada de HCl 0,5 N o NaOH 0,5 N. En este caso los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C y posteriormente durante otras 24 h a 30 °C.

Como método de selección de estirpes transformadas con plásmidos se utilizaron los siguientes antibióticos: 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (Ap), 20  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol (Cm), 100  $\mu\text{g/ml}$  de Sp, 25  $\mu\text{g/ml}$  de Sm o 25  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina (Km).

### **3.2. Métodos de manipulación de ácidos nucleicos *in vitro***

Los plásmidos desarrollados en este trabajo se describen en la siguiente Tabla 5. Así mismo, se utilizaron una serie de plásmidos, bien comerciales o bien desarrollados previamente en nuestro grupo o de colaboradores, que se describen en la Tabla 6.

**Tabla 5. Plásmidos generados en este trabajo.**

Nombre	Características	Plásmido parental	Resistencia a antibióticos
pEAC63	Gen <i>petJ-3</i>	pBluescript II SK (+)	Ap
pEACM*	Gen <i>cytM</i>	pBluescript II KS (+)	Ap
pCAT1	Fusión de GFP a la región promotora, más los tres primeros aminoácidos, del gen <i>petJ-3</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT2	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT3	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ-2</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT4	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petJ-3</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT5*	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>cytM</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT6*	Fusión de GFP al extremo C terminal del gen <i>petE</i>	pCSV3	Sm, Sp
pCAT7*	Gen <i>petJ-3</i> con una deleción de 236 pb	pRL278	Sm, Sp, Kn, Nm
pCAT8*	Gen <i>petJ-2</i> con una deleción de 250 pb	pRL278	Sm, Sp, Kn, Nm
pCAT9*	Gen <i>petJ-3</i> con 6 histidinas unidas al extremo C terminal	pCSV3	Sm, Sp

\*Estos plásmidos se diseñaron de forma racional y se encargaron al servicio de Genes sintéticos de la empresa Genecust (Apartado 2.8.)

### 3.2.1. Aislamiento y purificación de DNA genómico de *Nostoc*

Se recolectaron las células de 150 ml de cultivo, realizado en las condiciones descritas en el apartado 3.1.1. y se resuspendieron en 1,2 ml de tampón TE. La suspensión se distribuyó entre tres viales eppendorf de 1,5 ml de capacidad y a cada uno de ellos se le añadió: 150  $\mu$ l de perlas de vidrio estériles de 0,2 mm de diámetro, 20  $\mu$ l de SDS al 10 % (p/v), 250  $\mu$ l de fenol y 20  $\mu$ l de cloroformo. A continuación se aplicaron 10 ciclos de rotura mecánica que consistieron en la agitación de los tubos en un vórtex durante 1 min, seguido de 1 min de

enfriamiento en hielo. Posteriormente se sedimentaron las perlas de vidrio y los restos de células mediante centrifugación a 15 000  $\times g$  durante 15 min. Para eliminar las proteínas y los lípidos del sobrenadante, se añadieron a cada vial 250  $\mu l$  de fenol y 250  $\mu l$  de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 15 000  $\times g$  durante 4 min. Tras la centrifugación, en cada tubo aparecieron dos fases líquidas separadas por una interfase de color blanquecino. Se recuperó la fase menos densa y se desecharon la interfase y la fase más densa. Este paso de extracción de lípidos y proteínas se repitió dos veces más. Tras esto se obtuvo una solución diluida de ácidos nucleicos.

**Tabla 6. Plásmidos adicionales utilizados en este trabajo.**

Nombre	Características	Resistencia a antibióticos	Referencia
pCSV3	Plataforma de conjugación de <i>Nostoc</i>	Sm, Sp	Valladares <i>et al.</i> 2011
pRL278	Plataforma de conjugación de <i>Nostoc</i>	Kn, Nm	Cai y Wolk, 1990
pRL443	Plataforma de conjugación de <i>Nostoc</i>	Ap	Elhai <i>et al.</i> , 1988
pRL623	Plataforma de conjugación de <i>Nostoc</i>	Cm	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pBluescript II SK +	Plásmido de clonaje comercial	Ap	Stratagene
pGEM-T	Plásmido de clonaje comercial	Ap	Promega
pEAC6	Gen <i>petJ</i>	Ap	Molina-Heredia <i>et al.</i> , 1998
pEAC62	Gen <i>petJ-2</i>	Ap	Reyes-Sosa <i>et al.</i> , 2011
pEACF	Gen <i>petA</i>	Ap	Albarrán <i>et al.</i> , 2005
pEAPC	Gen <i>petE</i>	Ap	Molina-Heredia <i>et al.</i> , 1998
pEC86	Genes del operón <i>ccm</i> de maduración de citocromos de tipo <i>c</i> en el periplasma	Cm	Arslan <i>et al.</i> , 1998

Para precipitar los ácidos nucleicos se añadió a cada tubo 40  $\mu l$  de acetato potásico 3 M, pH 4,8, y 800  $\mu l$  de etanol absoluto; se agitaron e incubaron a  $-20$  °C durante 10 min y se centrifugaron a 10 000  $\times g$  y a 4 °C durante 10 min. El precipitado de los tres tubos se unificó y resuspendió en 250  $\mu l$  de tampón TE. Para eliminar el RNA se añadió 3  $\mu l$  de RNasa (1 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 15 min. Para eliminar los restos de proteínas de la solución se

añadieron 150  $\mu$ l de fenol y 150  $\mu$ l de cloroformo, se agitó y centrifugó a 15 000  $\times g$  durante 4 min. Tras la centrifugación, se recuperó nuevamente la fase menos densa y se repitió dos veces más esta extracción de proteínas, añadiendo solamente 150  $\mu$ l de fenol. Tras esto se precipitó el DNA genómico añadiendo 25  $\mu$ l de acetato potásico 3M, pH 4,8, y 500  $\mu$ l de etanol absoluto. Se agitó e incubó a  $-20$  °C durante 10 min y se centrifugó a 10 000  $\times g$  y a 4 °C durante otros 10 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 300  $\mu$ l de tampón TE y se cuantificó su concentración.

### 3.2.2. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de *E. coli*

Se utilizó el kit comercial “GeneJet Plasmid Miniprep Kit” (Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se partió de 3 ml de un cultivo a saturación de *E. coli* transformado con el plásmido de interés. Finalmente, el DNA se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua desionizada, en lugar del tampón sugerido en el kit.

### 3.2.3. Aislamiento de RNA de *Nostoc*

La biomasa procedente de cultivos de *Nostoc* se congeló en nitrógeno líquido y se homogeneizó mecánicamente con un mortero. Para el aislamiento de RNA total se utilizó 1 ml de la solución TRIsure (BIOLINE) por cada 50 mg de biomasa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el RNA se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua pura (sin RNasa). El RNA extraído se trató con DNasa RQ1 (Promega) antes de su uso como molde en reacciones de retrotranscripción. Para ello se incubaron de 1 a 10  $\mu$ g de RNA en un volumen final de 20  $\mu$ l de tampón TR con 2 U de DNasa durante 1 h a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 2 mM de EGTA pH 8,0 e incubando a 70 °C durante 10 min.

### **3.2.4. Análisis de ácidos nucleicos**

#### **3.2.4.1. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos en solución**

La concentración de las muestras de DNA o RNA se determinó mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), utilizando el software ND-1000 V.3.5.2.

#### **3.2.4.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Green y Sambrook [2012], en geles de agarosa al 0,8-2 % (p/v), preparados en tampón TBE y en presencia de GelRed (Intron), un análogo no tóxico del bromuro de etidio. Las electroforesis se llevaron a cabo en sistemas horizontales DNA SubCell (BioRad). A cada muestra se le añadió 1/10 volumen de tampón de carga de DNA.

Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a la electroforesis, se emplearon distintos marcadores según el tamaño a determinar (100 pb o 1 kb de Invitrogen y VIII de Sigma).

Tras la electroforesis, los geles se iluminaron con luz ultravioleta de 312 nm y se fotografiaron, utilizándose para ello un documentador de geles Gel Doc XR (BioRad) equipado con el software Quantity One V.4.6.8 (BioRad).

#### **3.2.4.3. Purificación de fragmentos de DNA**

Para purificar fragmentos de DNA en solución, o de geles de agarosa, se utilizó el kit FavorPrep (FavorPrep<sup>TM</sup> PCR and Gel purification kit, Favorgen) siguiendo

las instrucciones del fabricante. El DNA se eluyó de la columna utilizando un volumen de 40  $\mu$ l de agua desionizada.

### **3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **3.2.5.1. PCR**

Las PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler (Biometra). La reacción contenía, en un volumen total de 50  $\mu$ l, 10  $\mu$ l de tampón de la polimerasa, 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosforado, 0,2 pmoles de cada oligonucleótido utilizado como cebador (Tabla 7), 1,5 ng de DNA molde y 1,25 U de GoTaq polimerasa (Go Taq Flexi® DNA Polymerase, Promega). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95 °C, 30 s de renaturalización a temperatura variable y dependiente de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados y 1 min de extensión a 72 °C (el tiempo de extensión podía aumentar en función del tamaño del fragmento a amplificar).

El resultado de la PCR se analizó en geles de agarosa de concentración variable, dependiendo del tamaño de la banda esperada. La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo como se describe en el apartado 3.2.4.2.

#### **3.2.5.2. PCR de colonia**

En el caso de las PCR de colonias se usó el mismo termociclador y la misma enzima, pero en este caso la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20  $\mu$ l y el tampón de reacción contenía 10 mM de Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 40 mM de KCl; 0,16 mM de cada deoxinucleótido trifosfato; 0,5 pmoles de cada oligonucleótido y 0,05 U de polimerasa Taq (Go Taq® Flexi DNA Polymerase, Promega). Como molde se usó la biomasa de una colonia de

*E. coli* aislada de una caja de Petri, disuelta en H<sub>2</sub>O. Los oligonucleótidos utilizados fueron los específicos para cada gen, a 500 nM de concentración final. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 5 min a 95 °C, 5 min a 52 °C y 45 s a 72 °C, seguido de 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95 °C, 45 s de renaturalización a 55 °C y 2 min de extensión a 72 °C.

El resultado de la PCR se analizó en geles con concentración variable de agarosa, dependiendo del tamaño de la banda esperada.

### **3.2.6. Retrotranscripción (RT)**

La síntesis de cDNA se realizó con 1  $\mu$ g de RNA total usando el QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.7. PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo usando el SensiFAST SYBR & Fluorescein kit (BIOLINE) y el sistema *IQ5 Real-Time PCR detection system* (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó el siguiente perfil térmico estándar: 3 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Los oligonucleótidos usados para los análisis de qPCR (Tabla 7) fueron comprobados previamente en una RT-PCR, para comprobar que la amplificación del gen era la correcta.

### **3.2.8. Diseño racional de genes sintéticos**

Para el diseño racional de genes sintéticos se utilizó la herramienta DNA Works [Hoover y Lubkowski, 2002]. Se mejoró el uso de codones para *E. coli* y se introdujeron dianas de restricción para el posterior subclonado. Posteriormente,

la síntesis se encargó al servicio de genes sintéticos de la empresa GeneCust (Distribio).

**Tabla 7. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

Nombre	Secuencia (5' → 3')
C63-D	GCATAAGTTGCTAGAG
C63-R	GCTACACGAATTAGCTTG
AnaCMD	AACTTTTACAGGACACCTTATGGA
AnaCMR	TAAAATATGAATTCCTGATGTAAAAACC
PC-D	TAAAATGAATTCAGAAAAATAAAC
Adaptámero CM	AGCCGATGCAGAAGGTGTATGAAAGGAGACCCAATA
GFP C63-F PROM	TTTTAGCCATAAGCTTTTTAGTGCC
GFP C63-R PROM	ATGGATATCAATTATTCTCAAAGCATTTC
GFP C6-F	TTAAGCTTCATGCTGTAAGTGGC
GFP C6-R	CCGGGCTAGCGCCGCCGCCCTTCCAATCTGCATC
GFP C62-F	CCATCAATTTGAAGCTTGCAGTCTTTGCA
GFP C62-R	AAGCAAGGTCTCACGCCACGCCAGCCTT
GFP C63-F	TGCGGCAAGCTTGCGACGCTTAA
GFP C63-R	AAGCAAGGTCTCACGCCACCCTCTTTTTCCA
QPCR C6-F	CAGCAGACAGTGTAATGGAG
QPCR C6-R	CTTGAACCAAATTCTTGCCACC
QPCR C63-F	CCGAACTACCAACTGGAGCA
QPCR C63-R	ATTACCACCGCCTATGTGGC
QPCR PC-F	AACTAGGTAGCGATAAAGGACTG
QPCR PC-R	AAATTCAACCGTGTCACCTG
QPCR RNPB-F	GGGCGATTATCTATCTGGGAC
QPCR RNPB-R	TTACCAGTTCCGCTATCAGAG

### 3.2.9. Manipulación enzimática del DNA

#### 3.2.9.1. Restricción de DNA

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron suministradas por Amersham (Reino Unido), Roche (Alemania) o Takara (Francia) y se utilizaron

según las instrucciones de cada fabricante. Se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de DNA por cada 1 U de endonucleasa utilizada.

### 3.2.9.2. Clonación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA, amplificados por PCR, se clonaron en el vector pGEM-T (Promega). La reacción se llevó a cabo durante 16 h a 4 °C en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , en presencia de 30 mM de Tris-HCl pH 7,8, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de DTT, 1 mM de ATP, 3 U de ligasa de DNA del fago T4 (Promega) y 25 ng del vector, siguiendo un ratio de inserto:vector de 3:1. Los clones positivos se detectaron en cajas de LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) suplementadas con 0,2  $\mu\text{M}$  de X-Gal y 16  $\mu\text{M}$  de IPTG y se seleccionaron colonias blancas para su análisis.

Para la construcción de los vectores de expresión de los Cit  $c_{6-2}$  y  $c_M$  se utilizó el vector multifuncional pBluescript II (SK+) (Stratagene) [Alting-Mees *et al.*, 1989, 1992], en el cual se subclonaron los fragmentos de DNA clonados previamente en el vector pGEM-T, utilizando sitios de restricción únicos presentes en pGEM-T, pBluescript II (SK+) y en los genes amplificados. Para una mayor eficiencia en la ligación, se utilizó una relación aproximada de 3:1 (molar) inserto:vector. La mezcla de reacción y el método empleado para la ligación fueron los mismos que se utilizaron para la ligación de productos de PCR en pGEM-T.

### 3.2.9.3. Secuenciación del DNA

Las secuenciaciones de DNA se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de la empresa Secugen (Madrid).

### **3.3. Métodos de transformación genética**

#### **3.3.1. Transformación de *E. coli***

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

Las células competentes para la transformación por choque térmico fueron suministradas por el Servicio de Cultivos Biológicos del cicCartuja, preparadas siguiendo el método de Hanahan [1983]. Para realizar la transformación se mezclaron 40 ng del DNA transformante (hasta un máximo de 10  $\mu$ l) con 100  $\mu$ l de células competentes y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación se sometió a un choque térmico de 2 min a 42 °C y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. Tras esto se añadió 1 ml de caldo LB y se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las células fueron sembradas en cajas de Petri con agar-LB y el antibiótico adecuado para la selección de los transformantes.

##### **3.3.1.2. Transformación de *E. coli* mediante electroporación**

Las células electroporables fueron suministradas por el Servicio de Cultivos Biológicos del cicCartuja, preparadas siguiendo el protocolo del fabricante del electroporador Micro Pulser (BioRad). La electroporación se realizó conforme a las instrucciones del fabricante del electroporador utilizado. Se mezclaron 40 ng del DNA transformante (hasta un máximo de 10  $\mu$ l) con 50  $\mu$ l de células electroporables y se incubó en hielo durante 1 min. A continuación, la solución se pasó a una cubeta de electroporación (EP-102, Cell Projects) de 2 mm y se le aplicó una diferencia de potencial de 2500 V durante 5 ms, tras lo cual se añadió 1 ml de caldo-LB y se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las células se sembraron en cajas de Petri con agar-LB suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes.

### 3.3.2. Conjugación en *Nostoc*

La conjugación se llevó a cabo según el protocolo descrito por Elhai y Wolk [1988]. Se utilizó la estirpe de *E. coli* ED8654, que contiene el plásmido pRL443, el cual confiere la habilidad para formar los *pili* necesarios para la conjugación, junto con la estirpe de *E. coli* HB101, una estirpe que lleva el plásmido “cargo” (nuestro plásmido con la construcción de interés) y el plásmido “helper” pRL623. El plásmido pRL623 contiene los genes que codifican para las metilasas para los sitios de restricción *Ava*I, *Ava*II y *Ava*III [Elhai *et al.*, 1997], para proteger el plásmido cargo de la digestión por endonucleasas de la cianobacteria, así como el gen *mob*. En un segundo paso, ambos plásmidos se transfieren a *Nostoc*.

El proceso de la conjugación consistió en lo siguiente: 250  $\mu$ l de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* ED8654 y 350  $\mu$ l de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* HB101 se reinocularon en 10 ml de Caldo-LB con los antibióticos pertinentes, y se incubó a 37 °C en agitación durante 2,5 h. Las células en fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con caldo-LB para retirar los antibióticos y ambos cultivos se mezclaron hasta un volumen final de 300-500  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó durante 2 h sin agitación a 30 °C. Posteriormente, un cultivo de *Nostoc* que contenía 10  $\mu$ g/ml de clorofila *a* (Chl $a$ ) se añadió a la mezcla de *E. coli*. La nueva mezcla de las dos *E. coli* y la cianobacteria se distribuyó en un filtro de nitrocelulosa (Millipore) y se dispuso en una placa de Petri con agar-BG11 al que se le añadió un 5 % (v/v) de LB. La placa de Petri se incubó a 30 °C con luz continua (10  $\mu$ E $\cdot$ s $^{-1}$  $\cdot$ m $^{-2}$ ) durante al menos 3 h, para luego pasar a la intensidad de luz estándar (20  $\mu$ E $\cdot$ s $^{-1}$  $\cdot$ m $^{-2}$ ) durante toda la noche. Al día siguiente, el filtro se transfirió a una nueva placa de Petri con BG11 y se incubó durante un día a 30 °C con luz continua estándar. Posteriormente, el filtro se transfirió a una placa con medio BG11 suplementada con antibióticos y se incubó igual que el día anterior. Esta última incubación se realizó de 2 a 15 días, cambiando el filtro a una placa con medio BG11 suplementada con antibióticos cada 3 días, hasta

que en el filtro aparecieron colonias resistentes a antibióticos que fueron transferidas a placas con medio BG11 y antibióticos.

### **3.4. Purificación de membranas y metaloproteínas**

#### **3.4.1. Preparación de membranas enriquecidas en oxidasas terminales**

Para la obtención de membranas enriquecidas en oxidasas terminales de *Nostoc* se siguió el protocolo de Schmetterer y colaboradores [2001]. Para ello, se partió de 800 ml de cultivos de *Nostoc* con una densidad celular de 3-6  $\mu\text{g}$  de  $\text{Chl}a \cdot \text{ml}^{-1}$ . Después de recolectar las células por filtración, se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía 10 mM de HEPES pH 7,4; 5 mM de NaCl; sacarosa al 20 % (p/v) y 10 mg de lisozima. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 12 000  $\times g$  durante 5 min y se resuspendió en 6 ml de la misma solución por cada gramo de peso húmedo, y se incubó en hielo durante 1 h. Una vez incubada, se añadió 1 mM de PMSF y DNasa I al 0,005 % (p/v), y se sometió a rotura mecánica pasándola tres veces por una Prensa de French a 11 000 PSI de presión. Luego se centrifugó a 0 °C y 12 000  $\times g$  durante 10 min. A partir de este punto, dependiendo de la fuente de nitrógeno del cultivo, hubo variaciones en el protocolo. Cuando la fuente de nitrógeno utilizada fue nitrógeno atmosférico, el sobrenadante de esta centrifugación contenía muy poca cantidad de membranas, por lo que el sedimento se utilizó directamente en el siguiente paso. En el caso de células cultivadas en BG11, el sobrenadante se ultracentrifugó a 40 000 r.p.m. (en un rotor SW41Ti) a 4 °C durante 50 min y se descartó el sobrenadante. En ambos casos, los correspondientes sedimentos se resuspendieron en 10 mM de HEPES pH 7,4; 5 mM de NaCl; sacarosa al 20 % (p/v) a 4 °C y se homogeneizaron en un Potter y diluyeron hasta una concentración de proteína de entre 3-5 mg/ml.

### 3.4.2. Preparación de membranas enriquecidas en PS I

Las partículas de PS I de *Nostoc* se obtuvieron mediante solubilización con  $\beta$ -dodecilmaltósido según el protocolo descrito por Rögner [1990], con pequeñas modificaciones [Hervás *et al.*, 1994]. Todo el proceso se realizó en una cámara termostaticada a 4 °C y a baja intensidad de luz. Tras la sedimentación mediante centrifugación a 14 000  $\times g$  durante 20 min las células procedentes de 10 l de cultivo se lavaron, resuspendiéndolas en 100 ml de tampón A (20 mM de MES, pH 6,5; 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ ) y se sedimentaron de nuevo. El sedimento de células resultante se resuspendió en 100 ml de tampón C (tampón A + 1 M de sacarosa) y se incubó a 4 °C y con agitación suave en oscuridad durante 1 h. Las células se sedimentaron nuevamente y se volvieron a resuspender en 100 ml de tampón C suplementado con 1 mg/ml de lisozima, incubándose a 30 °C con agitación suave y en oscuridad durante 1 h. Después se añadieron inhibidores de proteasas (14 mg de PMSF, 13 mg de benzamidina y 11 mg de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico), una punta de espátula de DNasa y 10 ml de perlas de vidrio de 0,2 mm de diámetro. Las células se rompieron en un Omnimixer (Sorvall) mediante 10 ciclos de 30 s de agitación a la máxima potencia con dos min de enfriamiento en hielo. Las perlas de vidrio se separaron por filtrado en vacío en un embudo Buchner al que se le había colocado un organdí de nailon. La suspensión se centrifugó a 1500  $\times g$  y a 4 °C durante 6 min para eliminar las células que no se habían roto. El sobrenadante se centrifugó a 125 000  $\times g$  y a 4 °C durante 30 min para sedimentar las membranas tilacoidales. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón D (tampón B + glicerol al 20 % (p/v) e inhibidores de proteasas, siendo el tampón B: tampón A + 0,5 M de manitol) y se ajustó la concentración de Chla a 2 mg/ml. Dicha suspensión se almacenó a -80 °C para procesarla con posterioridad. Para la extracción de PS I se partió de una cantidad de membranas tilacoidales correspondiente a unos 20 mg de Chla. Las membranas se descongelaron y se diluyeron con tampón D hasta una concentración de 1 mg de Chla por ml y se les añadió  $\beta$ -dodecilmaltósido hasta una concentración final del 0,1 % (p/v). Dicha mezcla se incubó a 4 °C

con agitación suave y en oscuridad durante 10 min, centrifugándose a 184 000  $\times g$  y a 4 °C durante 30 min. El sedimento se resuspendió en tampón D +  $\beta$ -dodecilmaltósido al 1 % (p/v), ajustando la concentración de Chla a 1 mg/ml. La suspensión se incubó a 4 °C, en oscuridad y con agitación suave, durante 30 min y se centrifugó a 184 000  $\times g$  y a 4 °C durante 90 min. El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de tampón A + 0,25 M de manitol y se cargó en 6 tubos de gradiente discontinuo de sacarosa (7,5 ml) de las siguientes concentraciones de sacarosa en % (p/v): 8, 14, 32 y 40, en tampón B con  $\beta$ -dodecilmaltósido al 0,03 % (p/v). Se añadieron aproximadamente 6 ml de la suspensión a cada tubo. Dicho gradiente se centrifugó a 150 000  $\times g$  y a 4 °C durante 18 h. Se recogió la banda verde inferior, que se lavó y concentró en un sistema Amicon con membranas con un tamaño de poro de 100 kDa. Para el lavado se utilizó tampón Tricina-KOH 20 mM, pH 7,5 +  $\beta$ -dodecilmaltósido al 0,03 % (p/v). Finalmente se estimaron las concentraciones de clorofila y de P700 (Apartado 3.5.5.), se dividió la preparación en alícuotas y se almacenó a -80 °C. El rendimiento final fue de  $\sim 3$  mg totales de Chla, con una relación Chla/P700 de entre 130/1 y 150/1.

### **3.4.3. Expresión y purificación de las metaloproteínas recombinantes de *Nostoc* en *E. coli***

Los medios y las condiciones de cultivo se describen en el apartado 3.1.2. Las estirpes utilizadas se describen en la Tabla 8.

Como paso común previo a las purificaciones de las metaloproteínas, se procedió con una recolección y rotura de las células. En cada caso, cuando el cultivo alcanzó una dispersión de luz a 600 nm de entre 1,6 y 1,8, las células se sedimentaron por centrifugación a 9000  $\times g$  durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se congeló en nitrógeno líquido para extraer el periplasma. La pasta celular se descongeló y se volvió a repetir el ciclo de congelación/descongelación. Posteriormente, se resuspendió en 4 ml de agua

desionizada y se centrifugó a 12 000  $\times g$  durante 5 min, desechándose el sedimento. Posteriormente, el sobrenadante, que contenía la proteína en solución, se sometió a diferentes pasos de purificación, dependiendo de cada proteína.

**Tabla 8. Estirpes de *E. coli* utilizadas para la producción de las distintas metaloproteínas.**

Proteína	Estirpe utilizada
Citocromo $c_6$	MC1061
Citocromo $c_{6-2}$	JM109
Citocromo $c_{6-3}$	MC1061
Citocromo $c_M$	JM109
Citocromo $f$	BL21
Plastocianina	MC1061

#### 3.4.4. Expresión y purificación del citocromo $c_6$

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2. Se utilizó el vector de expresión pEAC-WT [Molina-Heredia *et al.*, 1998] añadiendo, además, el vector pEC86 [Arslan *et al.*, 1998] para la mejora en la producción de citocromos. Este plásmido sobreexpresa de forma constitutiva el *locus ccm* de *E. coli*, implicado en la maduración de citocromos de tipo *c* [Arslan *et al.*, 1998]. Posteriormente, se recogió el cultivo en fase exponencial y se procedió a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente frente a 5 mM de tampón fosfato potásico, pH 7,0. Tras esto, la solución se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico en una columna (2,5  $\times$  60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con una matriz CM-Cellulose (GE Healthcare). La elución se realizó aplicando un gradiente lineal de 0 a 400 mM de NaCl. Las cromatografías se llevaron a

cabo en el sistema integral de purificación LP-BioRad (BioRad). Tras este primer paso de purificación, el Cit  $c_6$  presentaba un grado de pureza de 1,1 (Apartado 3.5.7.) y no fueron necesarios más pasos de purificación. Las fracciones con mayor grado de pureza se unificaron, se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón fosfato pH 7,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a  $-20$  °C.

### 3.4.5. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-2}$

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2. Se utilizó el vector de expresión pEAC62 [Reyes-Sosa *et al.*, 2011], añadiendo además el vector pEC86 para la mejora en la producción de citocromos (Apartado 3.4.4.). Posteriormente, se recogió el cultivo en fase exponencial y se procedió a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0. Tras esto, la metaloproteína fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (2,5 × 60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con la matriz DEAE-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare), con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl. Tras esto, la proteína aún tenía un grado de impurezas alto, por lo que fue necesario otro paso de purificación. Las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico que tenían el mayor grado de pureza se concentraron por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro. Una vez concentradas hasta un volumen de 1 ml, se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S200 (GE Healthcare). La columna (1,5 × 70 cm, 120 ml) se equilibró previamente con 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 suplementado con 100 mM de NaCl (la adición de NaCl favorece que las proteínas no se unan de forma inespecífica a la matriz), solución usada para la elución de la proteína en un gradiente continuo. Las fracciones con mayor grado de pureza se identificaron por espectrofotometría UV/Vis, se unificaron,

se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.4.6. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-3}$**

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2. Se utilizó el vector de expresión pEAC63 [este trabajo], añadiendo además el vector pEC86 para la mejora en la producción de citocromos (Apartado 3.4.4.). Posteriormente, se recogió el cultivo en fase exponencial y se procedió a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl pH 8,0. Tras esto, la metaloproteína fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (2,5 × 60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con la matriz DEAE-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare), con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl. Las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico que tenían el mayor grado de pureza se concentraron por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro. Una vez concentradas hasta un volumen de 1 ml, se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S200 (GE Healthcare). La columna (1,5 × 70 cm, 120 ml) se equilibró previamente con 10 mM de tampón Tris-HCl pH 8,0, suplementado con 100 mM de NaCl, solución usada para la elución de la proteína en un gradiente continuo. Las fracciones con mayor grado de pureza se identificaron por espectrofotometría UV/Vis, se unificaron, se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.7. Expresión y purificación del citocromo $c_M$

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2. Se utilizó el vector de expresión pEACM [este trabajo], añadiendo además el vector pEC86 para la mejora en la producción de citocromos (Apartado 3.4.4.). Posteriormente, se recogió el cultivo en fase exponencial y se procedió a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0. Tras esto, la metaloproteína fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (2,5 × 60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con la matriz DEAE-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare), con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl. Las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico que tenían el mayor grado de pureza se concentraron por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro. Una vez concentradas hasta un volumen de 1 ml, se sometió a una cromatografía de exclusión molecular de Sephacryl-S200 (GE Healthcare). La columna (1,5 × 70 cm, 120 ml) se equilibró previamente con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, suplementado con 100 mM de NaCl, solución usada para la elución de la proteína en un gradiente continuo. Las fracciones con mayor grado de pureza se identificaron por espectrofotometría UV/Vis, se unificaron, se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a -20 °C.

### 3.4.8. Expresión y purificación del citocromo $f$

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2. Se utilizó el vector de expresión pEACF-WT [Albarrán *et al.*, 2005], que contiene una versión truncada soluble del Cit  $f$ , añadiendo además el vector pEC86 para la mejora en la producción de citocromos (Apartado 3.4.4.). Posteriormente, el cultivo se recogió en fase exponencial y se procedió

a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0. Tras esto, la metaloproteína fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico (2,5 × 60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con la matriz DEAE-Sepharose® CL-6B (GE Healthcare) con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl. Las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico que tenían el mayor grado de pureza se concentraron por ultrafiltración en un Amicon (Millipore), con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro. Una vez concentradas hasta un volumen de 1 ml, se sometió a una cromatografía de exclusión molecular de Sephacryl-S200 (GE Healthcare). La columna (1,5 × 70 cm, 120 ml) se equilibró previamente con 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, suplementado con 100 mM de NaCl, solución usada para la elución de la proteína en un gradiente continuo. Las fracciones con mayor grado de pureza se identificaron por espectrofotometría UV/Vis, se unificaron, se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a -20 °C.

#### **3.4.9. Expresión y purificación de la plastocianina**

La producción y expresión de la proteína se realizó según lo descrito en el apartado 3.1.2., utilizando el vector de expresión pEAPC-WT [Molina-Heredia *et al.*, 1998]. Posteriormente, el cultivo se recogió en fase exponencial y se procedió a realizar una primera rotura (Apartado 3.4.3.). El sobrenadante se dializó exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón fosfato pH 7,0. Tras esto, la metaloproteína fue sometida a una cromatografía de intercambio catiónico (2,5 × 60 cm, 100 ml, GE Healthcare) con la matriz CM-Cellulose (GE Healthcare), con un gradiente lineal de 0 a 400 mM de NaCl. Las cromatografías se llevaron a cabo en el sistema integral de purificación LP-BioRad (BioRad). Tras este primer paso de purificación, la Pc presentaba un grado de pureza muy alto y no fueron necesarios mas pasos de purificación.

Las fracciones con mayor grado de pureza se identificaron por espectrofotometría UV/Vis, se unificaron, se dializaron exhaustivamente durante 24 h frente a 5 mM de tampón fosfato pH 7,0, se concentraron hasta 0,5-1 mM por ultrafiltración en un Amicon (Millipore) con una membrana de 3 kDa de tamaño de poro y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5. Determinaciones analíticas**

#### **3.5.1. Cuantificación de proteínas**

El contenido de proteína total para extractos de proteínas de *E. coli* se determinó por el método Bradford [Bradford, 1976], utilizando el reactivo para proteínas de BioRad según las instrucciones del fabricante. Para la determinación de proteínas de membrana o de extractos de *Nostoc*, se siguió el método de Lowry [1951] conforme a la modificación descrita por Markwell y colaboradores [1978]. Para ambos métodos se utilizó la albúmina de suero bovino como patrón (Sigma).

#### **3.5.2. Electroforesis analítica en geles de SDS-Poliacrilamida**

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli [1970] usando geles de SDS-poliacrilamida al 12 o 15 % (p/v). Se utilizó el sistema Mini-Protean II de BioRad según instrucciones del fabricante. El gel de separación tenía una concentración de acrilamida:bisacrilamida (29:1) del 12 o 15 % (v/v), preparado en 375 mM de Tris-HCl pH 8,8, mientras que el gel de empaquetamiento contenía acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 4 % (p/v) preparado en 125 mM de Tris-HCl pH 6,8. Ambos geles contenían también SDS al 0,1 % (p/v). Se empleó APS al 0,7 % (p/v) y TEMED al 0,1 % (v/v) como catalizadores de la reacción de polimerización. Las placas de vidrio (10,2 × 7,3 cm) se montaron

paralelamente y separadas 1 mm según instrucciones del fabricante. Tras añadir y polimerizar el gel de separación, se añadió el gel empaquetador sobre el que se dispuso el peine de teflón de 10 pocillos de 5 × 13 mm. Las muestras se prepararon mezclando 15  $\mu$ l de soluciones proteicas con 5  $\mu$ l de tampón de carga de proteínas. Antes de cargar las muestras en el gel se calentaron a 100 °C durante 5 min. Las electroforesis se desarrollaron a temperatura ambiente, aplicando un voltaje constante de 150 V durante 20 min para posteriormente aumentar el voltaje hasta 200 V durante 30-45 min, utilizando el tampón de electroforesis como medio conductor entre los electrodos. Como patrón de tamaño se utilizó una solución de patrones preteñidos (PageRuler, Invitrogen).

### **3.5.3. Tinción de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida**

Tras finalizar la electroforesis las proteínas se localizaron fijándolas y tiñéndolas mediante inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 (BioRad) al 0,1 % (p/v) en ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v). Tras agitación continua durante 15 min a temperatura ambiente, los geles se lavaron repetidas veces en una solución de ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v). Las proteínas se visualizaron como bandas de color azul.

### **3.5.4. Detección inmunológica de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida mediante *Western Blot***

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amershan™ Protran™) de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro, utilizando un método de transferencia semi-húmedo (Trans-Blot® Turbo, BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 min. La eficiencia de la transferencia se comprobó por la desaparición de los patrones preteñidos del gel y por

tinción con Rojo Ponceau al 0,2 % (Amresco) de la membrana. Una vez terminada la transferencia, la membrana se incubó durante al menos 2 h con solución de bloqueo, consistente en leche semidesnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) al 5 % (p/v) y Tween 20 al 0,1 % (v/v) en tampón PBS. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:1000, en solución de bloqueo durante 16 h a 4 °C y en agitación suave constante. La membrana se sometió a cuatro lavados de 15 min en una solución compuesta por tampón PBS suplementado con Tween 20 al 0,1 % (v/v) y se incubó posteriormente con una solución de anticuerpo (inmunoglobulina G) de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugado con la peroxidasa de rábano (Sigma) diluido 1:5000 en solución de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Seguidamente la membrana se sometió de nuevo a cuatro lavados de 15 min en la solución de lavado. La presencia de proteínas se detectó mediante la actividad peroxidasa conjugada en el anticuerpo secundario, utilizando el kit Inmobilon® Western (Millipore) según las instrucciones del fabricante.

### **3.5.5. Determinación de la concentración de clorofila y de PS I de *Nostoc* en solución**

La concentración de Chl<sub>a</sub> se determinó según el método de Mackinney [1941]. Para ello, 1 ml de cultivo se centrifugó a 12 000 ×g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de metanol. Esta solución se agitó en vórtex durante 1 min y se volvió a centrifugar a 12 000 ×g durante 5 min. Posteriormente, la densidad óptica se midió a 665 nm utilizando como coeficiente de extinción:  $\epsilon=74,46 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

La concentración de clorofila de las preparaciones de membranas enriquecidas en PS I se determinó mediante la extracción de pigmentos con acetona y medida de la absorbencia a 652 nm según el método descrito por Arnon [1949]. Se diluyó 50 µl de suspensión de membranas en 1,5 ml de acetona al 80 %

(v/v), se homogeneizó agitando vigorosamente y se centrifugó a  $13\ 000 \times g$  y a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se midió la absorbancia del sobrenadante a 652 nm y se calculó la concentración de clorofila utilizando un coeficiente de extinción de  $34,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

La pureza de las preparaciones de PS I viene dada por la relación Chl $a$ /P700. El contenido en P700 de las muestras de PS I se calculó a partir de los cambios fotoinducidos de absorbancia a 820 nm, medidos mediante espectroscopia de excitación por láser (Apartado 3.3.7.), utilizando un coeficiente de absorción de  $6,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [Mathis y Sétif, 1981].

### 3.5.6. Espectro, concentración y pureza de las metaloproteínas

Para la detección de las fracciones que contenían la metaloproteína durante su purificación, así como para la determinación de su grado de pureza y concentración, se midió la absorción de luz de éstas en solución utilizando un espectrofotómetro Jasco V-650 (Jasco). Los espectros de absorción de los citocromos se realizaron entre 250 y 650 nm y los de la Pc entre 250 y 750 nm. La pureza de las preparaciones de metaloproteínas se determinó por la relación entre la absorbancia a 275 (longitud de onda a la cual absorben los residuos de tirosina) y la banda de máximo de absorbancia de la proteína (en el estado reducido en los Cit y oxidado en la Pc). Los datos sobre la relación de pureza y picos de máxima absorción se encuentran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Máximos de absorción en la banda  $\alpha$  y la relación de pureza obtenida para los citocromos y la plastocianina estudiados.**

Proteína	Máximo de absorbancia en la banda $\alpha$	r	Referencia
Cit $c_6$	553	1,00	Molina-Heredia <i>et al.</i> , 1998; 1999
Cit $c_{6-2}$	553	1,50	Reyes-Sosa <i>et al.</i> , 2011
Cit $f$	556	2,75	Albarrán <i>et al.</i> , 2005
Pc	598	1,20	Molina-Heredia <i>et al.</i> , 1998; 1999
Cit $c_{6-3}$	552	1,17	Este trabajo
Cit $c_M$	550	0,78	Este trabajo

### 3.5.7. Determinación del coeficiente de extinción milimolar de los citocromos $c_{6-3}$ y $c_M$

Para la determinación del coeficiente de extinción de las hemoproteínas se utilizó el método del piridín-hemocromo [Berry, 1987]. La concentración de los reactivos fue de 40  $\mu\text{M}$  de Cit, 200 mM de NaOH, piridina al 40 % (p/v) y 0,1 M de ferricianuro potásico. A su vez, se midió el espectro diferencial ditionito–ferricianuro, para la cuantificación diferencial reducción–oxidación, en un espectrofotómetro V-650 (Jasco) tras la reducción con cristales de ditionito sódico y se determinó el coeficiente de extinción del citocromo utilizando un valor de  $24,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para el piridín-hemocromo.

### 3.5.8. Determinación del punto isoelectrico de las metaloproteínas

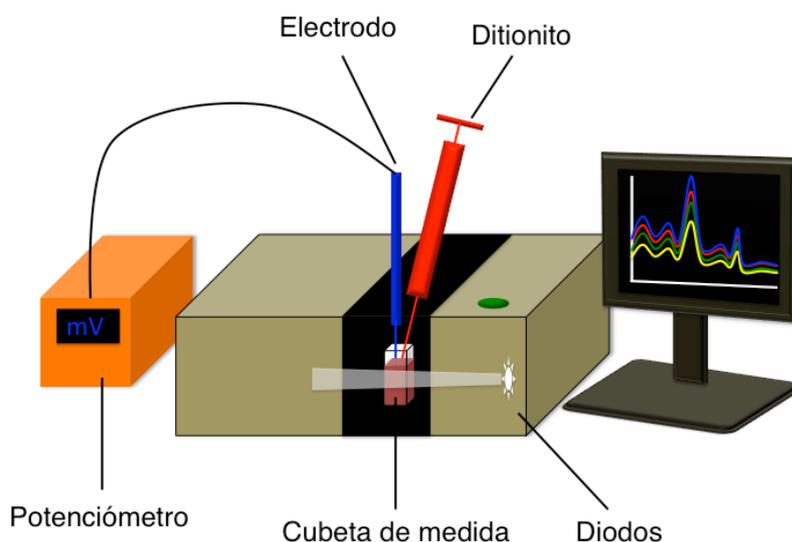
La determinación del punto isoelectrico de las metaloproteínas de *Nostoc* expresadas en *E. coli* se realizó según el método descrito por Robertson y colaboradores [1987], en un soporte Mini-Protean II (BioRad). El gel contenía acrilamida/bisacrilamida al 5 % (p/v), glicerol al 9 % (p/v) y anfolito Biolite 5-7 (BioRad) al 1 % (v/v). Las muestras contenían 40  $\mu\text{g}$  de proteína total y se prepararon en un tampón de carga que contenía el mismo anfolito al 2 % (v/v) y glicerol al 60 % (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C y a 150 V durante 3 h. Tras la electroforesis, las proteínas se tiñeron y posteriormente destiñeron según lo descrito en el apartado 3.5.3.

### 3.5.9. Potenciometría rédox

Las titulaciones rédox de los citocromos se realizaron en anaerobiosis siguiendo el método descrito por Dutton y Wilson [1974], con pequeñas modificaciones [Ortega *et al.*, 1988; Molina-Heredia *et al.*, 1998]. Se preparó una cubeta que contenía 10  $\mu\text{M}$  de ferricianuro potásico y 20  $\mu\text{M}$  de cada uno

de los siguientes mediadores: benzoquinona ( $E_{m,7} = +293$  mV), diaminodurool ( $E_{m,7} = +240$  mV) y menadiona ( $E_{m,7} = +422$  mV), en un volumen final de 2,5 ml. La mezcla de reacción se sometió a agitación y gaseo mediante burbujeo con argón para asegurar la anaerobiosis. Posteriormente se añadieron 10  $\mu$ M de la proteína en 50 mM de fosfato pH 7,0 y se midieron los cambios de absorbancia en la banda  $\alpha$  de cada Cit (en el entorno de los 550 nm) menos la absorbancia a 570 nm, tras la adición sucesiva de pequeñas cantidades de ditionito sódico (50 mg/ml) preparado en el mismo tampón de ensayo, a la vez que se medían los cambios en el potencial rédox.

El potencial rédox se midió con un electrodo de Pt-Ag/AgCl MI-800 (Microelectrodes Inc.) de 4 mm de diámetro, calibrado previamente con una solución saturada de quinhidrona ( $E_{m,7} = +280$  mV) a 20 °C y se registró en un potenciómetro digital Metrohm modelo 654. Los cambios de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro de diodos UV/Vis Hewlett-Packard 8452A. Los datos se ajustaron a la ecuación de Nernst para  $1e^-$ . En la Figura 6 se puede ver el esquema del montaje del sistema.



**Figura 6. Esquema del sistema de medida utilizado para la determinación de los potenciales rédox.**

### 3.5.10. Determinación de la tasa de consumo de O<sub>2</sub>

Para la medida del consumo de oxígeno se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark, modelo Oxygraph (Hansatech), con cátodo de platino y ánodo de Ag-AgCl. Las medidas se realizaron según Yu y colaboradores [2009] con ligeras modificaciones, a 25 °C de temperatura y en oscuridad. Para la determinación de la actividad citocromo *c* oxidasa (Cox) la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, 5 mM de tampón HEPES pH 7,5; 2,5 mM de NaCl, 2 mM de ascorbato sódico y una cantidad de membranas enriquecidas en oxidasas (Apartado 3.4.1) de entre 3-5 mg/ml, así como 20 μM de cada proteína ensayada. Los resultados se analizaron mediante el programa informático Oxygraph acoplado al sistema. A partir de la representación de la concentración de oxígeno disuelto en la muestra a lo largo del tiempo se calcularon las tasas de consumo de oxígeno.

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

Los experimentos de ITC se realizaron en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos, en colaboración con el Dr. Adrián Velázquez Campoy, en un Auto-ITC200 (Microcal, GE Healthcare). La mezcla de reacción contenía 5 mM de tampón fosfato pH 7,5 suplementado con Triton X-100 al 0,02 % (p/v). Las determinaciones se realizaron a 25 °C y una agitación de 1000 r.p.m. La célula de referencia contenía agua destilada. Los experimentos se llevaron a cabo mediante adiciones sucesivas (2 μl) de las soluciones de metaloproteínas (400 μM) a la célula que contenía el Cit *f* concentrado (40 μM). Todas las soluciones se desgasearon previamente. Las adiciones se hicieron a intervalos de tiempo concretos para evitar un efecto aditivo del calor generado por la propia inyección de muestra. Los datos sobre los controles del experimento fueron directamente sustraídos de los valores medidos para cada caso. La normalización del calor de inyección, como función de la tasa molar, fue analizado con Origin 6 (OriginLab). En todos los casos, el calor desprendido

durante la titulación correspondía a una estequiometría de asociación de 1:1. Se determinaron los valores de la constante de asociación ( $K_A$ ), así como de la constante de disociación ( $K_D$ ), de la entalpía de unión ( $\Delta H$ ), de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y de la entropía ( $\Delta S$ ). Los errores estimados para cada determinación fueron del 15 % para la constante de equilibrio, del 5 % para la entalpía de unión y de la entropía, y del 2 % para la Energía libre de Gibbs de Unión.

### **3.5.12. Determinación del peso molecular por MALDI-TOF**

El peso molecular de las metaloproteínas se determinó por el Servicio de Proteómica del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis mediante análisis MALDI-TOF (Bruker-Daltonics, Alemania). Para ello, se le proporcionó al servicio 5  $\mu$ l de proteína pura a una concentración de 1 mM en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5.

### **3.5.13. Secuenciación del extremo N-terminal**

Para la secuenciación del extremo amino terminal se preparó una muestra que contenía 50  $\mu$ g de proteína en 200  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5. La secuenciación se realizó en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid.

## **3.6. Cristalografía de rayos-X**

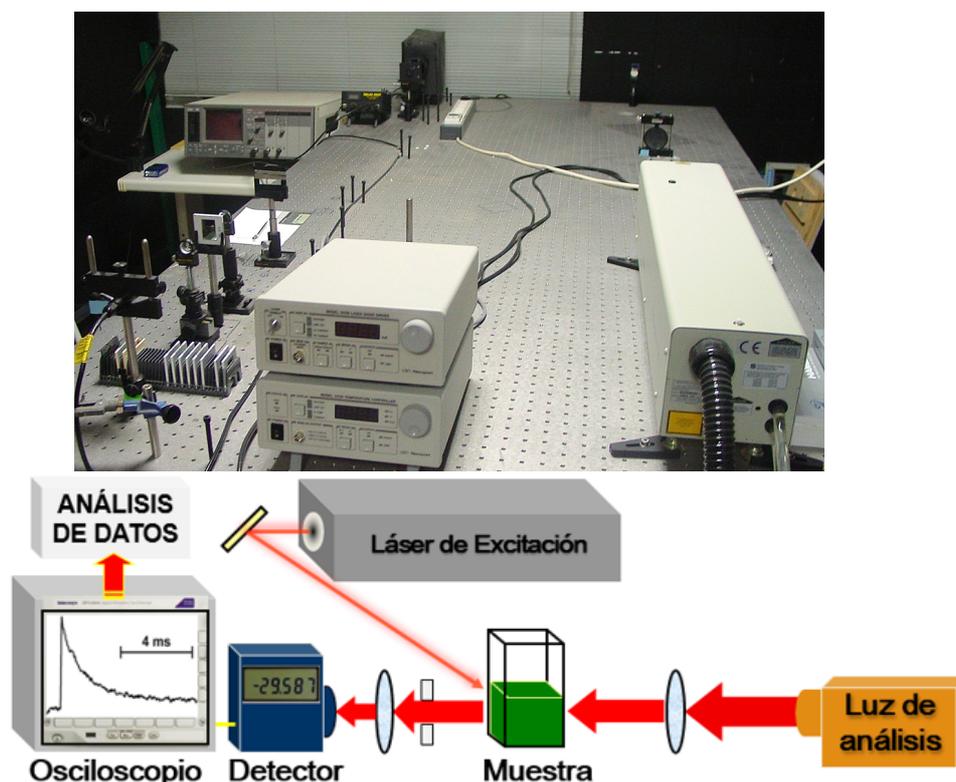
La cristalografía de rayos-X se llevó a cabo en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos en colaboración con la Dra. Marta Martínez Júlvez.

### 3.7. Espectrofotometría cinética inducida por láser

La funcionalidad de las metaloproteínas se analizó midiendo su reactividad hacia el PS I de *Nostoc*. El PS I excitado con un corto pulso de luz láser reduce a un aceptor de electrones exógeno (el metilviológeno en las condiciones experimentales de este trabajo), quedando el P700 oxidado y preparado para recibir un electrón del donador. La reducción del PS I por sus donadores puede seguirse midiendo los cambios de absorbancia a 820 nm, longitud de onda a la cual el dímero de clorofila P700 del PS I presenta un cambio de absorbancia específico según su estado rédox. Esta reacción se puede repetir cada pocos segundos en presencia de un reductor exógeno, como el ascorbato, que reduce a las metaloproteínas donadoras.

El sistema utilizado (Figura 7) consta de un láser de Nd-YAG modelo INDI-HG (Spectra-Physics) a una longitud de onda 532 nm, en pulsos de 4 ns. El haz láser se atenuó con filtros neutros hasta conseguir justo la intensidad de luz de excitación saturante para evitar sobreexcitar el PS I a lo largo del experimento. La luz de análisis la proporcionó un diodo láser de 820 nm y 150 mW, modelo LQN830-150C (Newport). Tras atravesar la cubeta, la luz de análisis se recogió en un fotodiodo de silicio modelo SM1PD1A (ThorLabs). El fotodiodo se protegió de la luz de excitación, de la luz difusa reflejada y de la luz de fluorescencia de la muestra mediante un filtro Oriel de vidrio de banda estrecha de 820 nm. La señal de salida del fotodiodo se amplificó mediante un amplificador de alta impedancia (Melles Griot 13AMP005) y se recogió en un osciloscopio digital Nicolet 450. El haz láser se sincronizó con el osciloscopio mediante un generador de pulsos integrado en el sistema láser, lo que permitía activar el osciloscopio justo antes del impacto del haz láser sobre la cubeta de ensayo. Todos los experimentos se realizaron a 22 °C en una cubeta de 1 mm de paso de luz. La mezcla de reacción contenía: 20 mM de Tricina-KOH pH 7,5,  $\beta$  dodecilmaltósido al 0,03 % (p/v), 0,1 mM de metilviológeno, 2 mM de ascorbato sódico y una cantidad de membranas enriquecidas en PS I equivalente a 0,3 mg/ml de clorofila, en un volumen final de 200  $\mu$ l. En los

ensayos de concentración de proteína, la mezcla de reacción se suplementó con 10 mM de  $MgCl_2$  y con la proteína de interés a una concentración variable. En los ensayos de concentración de proteína a baja fuerza iónica no se añadió  $MgCl_2$ . En los casos en los que se realizaron ensayos de concentración de  $NaCl$  y  $MgCl_2$  se utilizó una concentración de proteína de 100  $\mu M$ .



**Figura 7. Fotografía y esquema del sistema de espectrofotometría cinética inducida por láser.**

Para el análisis de los datos cinéticos, se tomó un promedio de 6-8 medidas independientes con un intervalo de 30 s entre cada disparo del láser. Las constantes cinéticas determinadas en la mayoría de los experimentos tuvieron un error no superior al 10 % del valor absoluto, según la relación señal/ruido y la repetitividad de los datos. Los experimentos cinéticos se realizaron en condiciones de pseudo-primer orden, al estar la proteína donadora de electrones en exceso con respecto al PS I (>10:1). Los trazos cinéticos se analizaron como sumas de exponenciales para calcular las constantes de reacción, lo que permite analizar cinéticas multifásicas. Para esto se utilizó un

programa informático (cedido por el Dr. P. Sétif, Saclay, Francia) basado en el método Marquardt. Los resultados se analizaron según los modelos cinéticos propuestos previamente por Hervás y colaboradores [1995]. En el caso de *Nostoc* se pueden así estimar valores para la constante bimolecular de segundo orden de la reacción ( $k_{\text{bim}}$ ), para la constante bimolecular extrapolada a fuerza iónica infinita ( $k_{\text{inf}}$ ) y para la constante de primer orden de transferencia electrónica ( $k_{\text{ET}}$ ).

### 3.8. Técnicas Microscópicas

Los análisis mediante microscopía se realizaron en los equipos disponibles en el Servicio de Microscopía del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

#### 3.8.1. Microscopía óptica

Los cultivos de *Nostoc* se visualizaron utilizando un microscopio Olympus BX60 (Olympus) con un objetivo UplanFI 40x/0,75Ph2 o con uno de mayor aumento, el UplanFI 100x/1,30, con aceite de inmersión.

#### 3.8.2. Microscopía confocal láser para la visualización de la *GFP*

Las muestras se visualizaron utilizando un objetivo de inmersión HCX PLAM-APO 63x 1,4 NA en un microscopio Leica TCS SP2 (Leica Microsystems). Las muestras se excitaron a 488 nm usando un láser de argón. La fluorescencia fue monitorizada en un rango de 500-540 nm (para visualizar la *GFP*) o bien de 630-700 nm (para la autofluorescencia de la cianobacteria). La muestra se obtuvo de un cultivo de la cianobacteria en agar. A partir de dicha placa, se recortó un fragmento de agar que contuviese el microorganismo, para poder ver todas las células en el mismo plano. Las

imágenes se trataron con el software de imagen LAS AF Leica software (Leica Microsystems) así como con el software libre ImageJ.

### **3.8.3. Microscopía de fluorescencia**

#### **3.8.3.1. Visualización de la *GFP***

Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio Leica DM6000B (Leica Microsystems) con objetivos de 40x y 63x, unido a una cámara ORCA-ER (Hamamatsu). La fluorescencia de la *GFP* fue detectada utilizando un filtro FITC L5, con una ventana de excitación BP (band-pass) de 480/40 y una de emisión BP 572/30. La autofluorescencia fue detectada utilizando un filtro Texas Red TX2 con una ventana de excitación de BP 530/40 y una ventana de emisión de BP 645/75. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software de imagen LAS AF Leica (Leica Microsystems) así como con el software libre ImageJ.

#### **3.8.3.2. Inmunofluorescencia**

Para visualizar el Cit  $c_{6-3}$  mediante inmunofluorescencia, se partió de 1,5 ml de un cultivo líquido ( $2-3 \mu\text{g}$  de  $\text{Chla} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) de *Nostoc*. Se concentró hasta  $100 \mu\text{l}$  y se dispuso en un portaobjetos pretratado con poly-L-Lisina (Sigma) y se cubrió con un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore). Posteriormente, el filtro se retiró y se dejó secar el portaobjetos, tras lo cual se incubó durante 3 h en etanol al 70 % a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  y se secó durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces (2 min cada vez) con tampón PBS-T (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 5,5 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y Tween 20 al 0,05 % (p/v)) y se trataron con tampón de bloqueo (PBS-T + 5 % (p/v) de leche semi-desnatada en polvo) durante 20 min, seguido de una incubación durante 90 min con el anticuerpo primario 6x Anti-His *rabbit* (Sigma) diluido 1:500 veces

en tampón de bloqueo. Tras esto, se lavaron 3 veces las células con tampón PBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC (Sigma) diluido 1:500 veces en tampón de bloqueo, durante 45 min en oscuridad. Tras la incubación, se lavó 3 veces mas con PBS-T y se dejó secar 5 min. Por último, se añadieron 1-2 gotas de FluorSave (CalBiochem), se cubrió con un cubreobjetos y se selló con laca de uñas.

### 3.9. Análisis bioinformático

Para la búsqueda de secuencias de DNA y proteínas por homología se utilizó el programa *BLAST Search* [Altschul *et al.*, 1990]. Para comparar varias secuencias a la vez se utilizaron los servidores *T-COFFEE* [Notredame *et al.*, 2000] y *Clustal W* [Larkin *et al.*, 2007]. Los árboles filogenéticos se realizaron en *FigTree* V.1.4.0 (Andrew Rambaut, *Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh*), a partir de las matrices de distancia determinadas con el servidor *Molphy* [Adachi y Hasegawa, 1992]. Para el diseño de oligonucleótidos, plásmidos y simulación de digestiones de secuencias de DNA se utilizó el programa *Serial Cloner* (Serial Basics). Para el modelado y visualización del potencial de superficie se utilizó el programa *Swiss-Pdb Viewer* [Guex *et al.*, 1997] y *Chimera* 1.11 [Pettersen *et al.*, 2004]. Para realizar la predicción de las estructuras secundaria y terciaria probables se utilizó el programa *Phyre<sup>2</sup>* [Kelley *et al.*, 2009]. Para el diseño y optimización de genes sintéticos se utilizó el servidor *DNA Works* [Hoover y Lubkowski, 2002]. Para el *docking* molecular se utilizó el servidor *ClusPro* 2.0 [Comeau *et al.*, 2004]. Para determinar los parámetros físico-químicos teóricos de las proteínas se usó la herramienta *ProtParam* [Gasteiger *et al.*, 2005]. Para la localización de posibles regiones transmembrana de las proteínas se utilizó el servidor *Phobius* [Käll *et al.*, 2007]. Para la predicción de posibles dianas de proteólisis se utilizó el programa *SignalP* 1.1 [Nielsen *et al.*, 1997]. Para el diseño de los plásmidos se utilizó el servidor *Plasmapper* V.2.0 [Dong *et al.*, 2004].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Citocromo $c_{6-3}$

Partiendo de los datos previos del grupo sobre citocromos alternativos, se buscaron en la *Cyanobase* (*Kazusa DNA Research Institute*) genes que codificasen para proteínas homólogas al Cit  $c_6$  de *Nostoc* sp. PCC 7119. El objetivo de esta búsqueda era localizar posibles isoformas del Cit  $c_6$  en cianobacterias. Los genes encontrados en *Nostoc* sp. PCC 7119 codificaban para el Cit  $c_6$  canónico, para el Cit  $c_{6-2}$  descrito por nuestro grupo previamente, para el Cit  $c_M$  y para un cuarto Cit de tipo  $c$  (clase I) que no había sido descrito previamente. En un principio, dentro de la *Cyanobase* este cuarto tipo de Cit se localizó sólo en *Anabaena variabilis* (Ava\_2744) y en *Nostoc punctiforme* (Npun\_R2788). Prestando más atención al genoma de la cianobacteria modelo *Nostoc* sp. PCC 7120, se localizó la secuencia *AsI0256*, la cual resultaba demasiado corta como para codificar un Cit. Analizando en profundidad dicha región, se observó que el gen se encontraba mal anotado en la base de datos, ya que existe una secuencia, comprendida entre las posiciones 276724 y 277089, que constituye un análogo del Cit  $c_6$ , presentando un 97 % de homología con la secuencia del Cit de tipo  $c$  (clase I) de *Anabaena variabilis*. Dado que dicho gen presenta una alta homología con el gen *petJ*, que codifica para el Cit  $c_6$ , y con el gen *petJ-2*, que codifica para el Cit  $c_{6-2}$ , se decidió denominar a dicho gen con el nombre *petJ-3* y Cit  $c_{6-3}$  a la proteína para la que codifica.

A partir de la secuencia del Cit  $c_{6-3}$  de *Anabaena variabilis* se realizaron búsquedas de secuencias homólogas en las bases de datos generales (*GenBank*, *DDBJ*, *ENA*). En estas búsquedas, el Cit  $c_{6-3}$  sólo se encontró en las familias de cianobacterias *Stigonematales* y *Nostocaceae*, más específicamente en los géneros *Anabaena*, *Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Fischerella*, *Calothrix* y *Cylindrospermopsis*, todos ellos de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. También se encontró el Cit  $c_{6-3}$  en el

género *Raphidiopsis*, formado por estirpes de cianobacterias filamentosas que han perdido la capacidad de diferenciar heterocistos [Mohamed, 2007].

El hecho de encontrar una nueva variante del Cit  $c_6$  presente exclusivamente en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos abre la puerta a pensar que dicha proteína podría estar involucrada bien en la función o bien en la diferenciación del heterocisto. Así pues, se decidió clonar, purificar y caracterizar físico-química y funcionalmente dicha proteína.

#### **4.1.1. Clonación del gen *petJ-3***

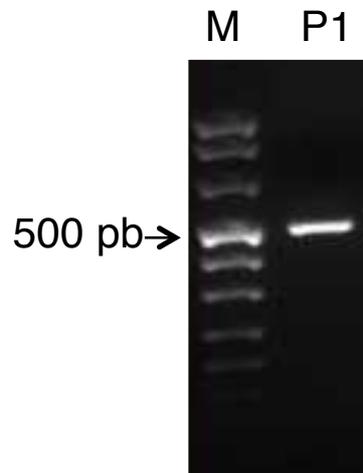
A partir de la secuencia del gen *Ava\_2744* de *Anabaena variabilis*, se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar por PCR el gen ortólogo de *Nostoc* sp. PCC 7119, tal y como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos. Se eligió esta estirpe en concreto, y no la PCC 7120 que se encuentra secuenciada, debido a que la mayoría de estudios publicados sobre las cadenas fotosintética y respiratoria se han realizado en ella. Los oligonucleótidos diseñados fueron:

**C63-D** GCATAAGATGCTAGAG

**C63-R** CAAGCTTAATTCGTGTAGC

Las secuencias utilizadas para el diseño de estos oligonucleótidos estaban localizadas fuera de la fase abierta de lectura (ORF), con el fin de amplificar la región codificante completa del gen. Para facilitar el posterior análisis y subclonación de las secuencias amplificadas mediante PCR, en el oligonucleótido C63-R se introdujo una diana de restricción *HindIII*, que no estaba presente en el vector pGEM-T y sí en el sitio de clonación del vector pBluescript II (SK+).

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa (Figura 8).

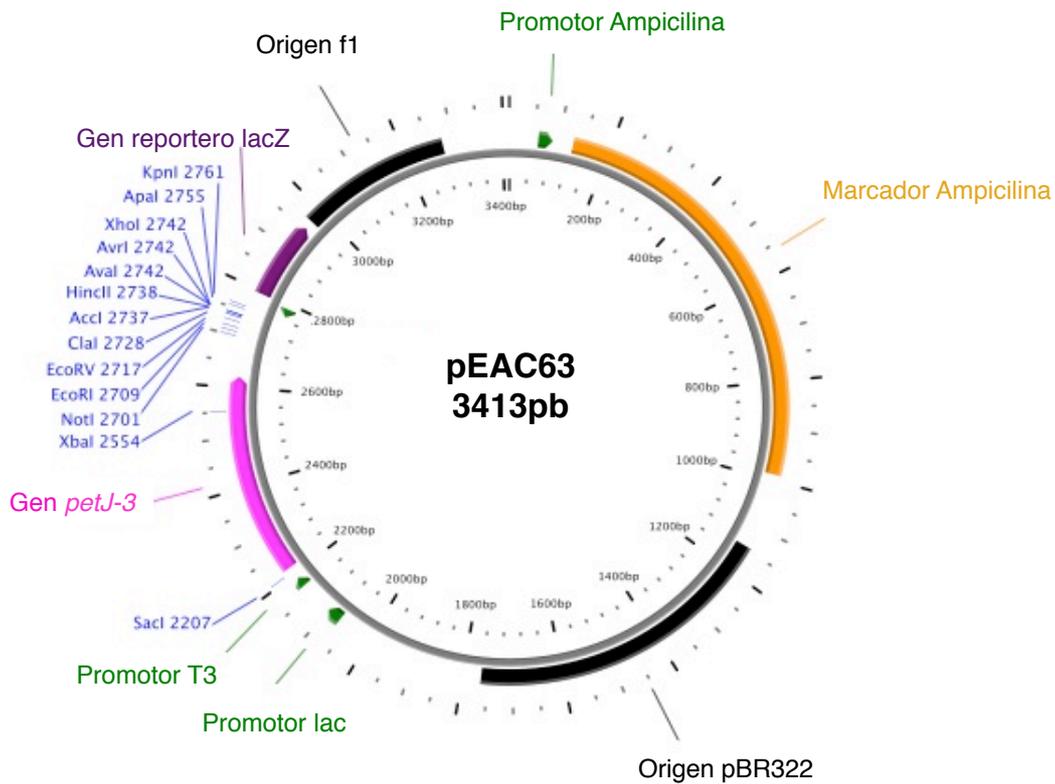


**Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR.** M: patrón de peso molecular, P1: producto de PCR de la amplificación del gen que codifica para el citocromo  $c$  (clase I) de *Nostoc* sp. PCC 7119.

Como se observa en la Figura 8, sólo se amplificó un fragmento de PCR, el cual se ligó en pGEM-T y, posteriormente, se subclonó en pBluescript II SK (+), generando el plásmido pEAC63 (Figura 9). Para estar seguro de que la PCR no introducía ningún error, se realizaron tres reacciones de PCR y tres secuenciaciones independientes. El resultado de la secuenciación (Figura 10), se depositó en la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos EMBL, con el número de acceso: **HG316543**.

#### 4.1.2. Análisis de la secuencia del citocromo $c_{6-3}$

Una vez clonado y secuenciado, se procedió a analizar la secuencia de la proteína que codifica el gen *petJ-3*. Primero se realizó un análisis comparativo entre las tres secuencias de los Cit  $c_6$ ,  $c_{6-2}$  y  $c_{6-3}$  de *Nostoc* sp. PCC 7119 (Figura 11).



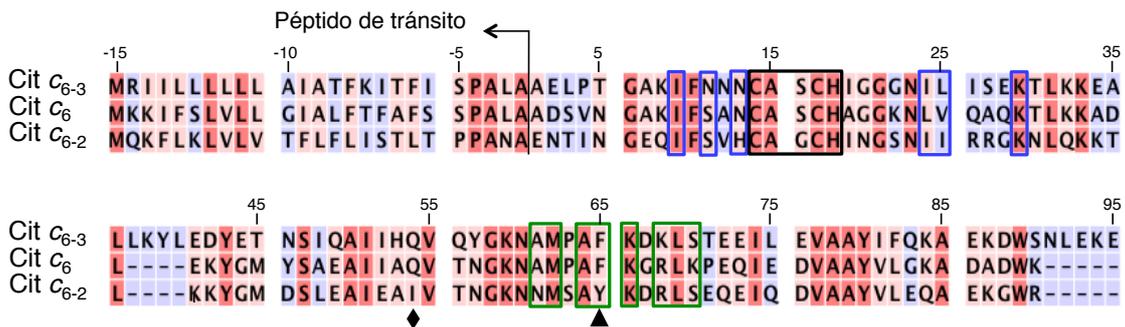
**Figura 9. Plásmido pEAC63 para la expresión del citocromo  $c_{6-3}$ .** El plásmido original es el pBluescript II SK (+) con la inserción de la región codificante para el gen *petJ-3* (rosa).

Lo primero que se observó fue que, al igual que en los Cit  $c_6$  y  $c_{6-2}$ , el Cit  $c_{6-3}$  posee un péptido de tránsito de 25 aminoácidos que podría ser capaz de enviar la proteína hacia el espacio periplásmico o al lumen tilacoidal. Este péptido sería muy similar al del sistema de transporte tipo *Sec*, que transloca la proteína hacia dicho espacio, donde se pliega. El péptido de tránsito contiene tres regiones bien definidas: una región N-terminal con carga neta positiva, una región central hidrófoba y una región C-terminal que posee un motivo conservado AXA para el procesamiento por medio de peptidasas. La localización subcelular del Cit  $c_{6-3}$  es un punto clave en el establecimiento de la función, por lo que la presencia de un péptido de tránsito muy similar al del Cit  $c_6$  sugiere una localización celular similar a éste (Figura 12).

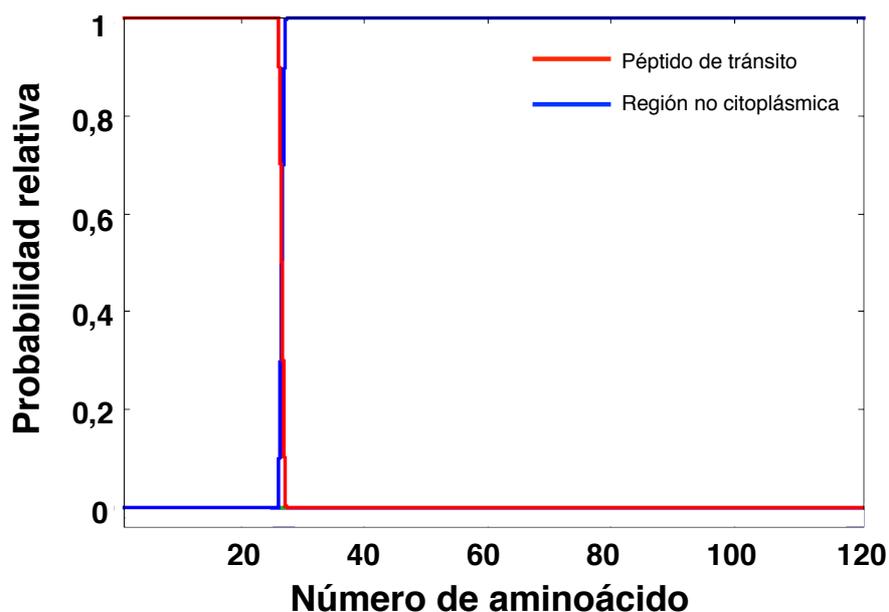
```

TTG AGA ATA ATT TTA TTA CTA TTA TTT TTG GCG ATC GCT ATA TTT < 45
L R I I L L L L F L A I A I F
AAA CTT ACA TTT ATC AGT CCA GCC CTA GCC GCC GAA CTA CCA ACT < 90
K L T F I S P A L A A E L P T
GGA GCA AAA ATT TTT AAT AAT AAC TGC GCT TCC TGC CAC ATA GGC < 135
G A K I F N N N C A S C H I G
GGT GGT AAT ATA CTT ATT TCT GAA AAA ACA CTC AAA AAA GAA GCA < 180
G G N I L I S E K T L K K E A
TTA TTA AAG TAC CTG GAA GAT TAT GAG ACG AAC TCA ATC CAG GCC < 225
L L K Y L E D Y E T N S I Q A
ATT ATC CAT CAG ATA CAG TAT GGC AAA AAC GCC ATG CCT GCT TTT < 270
I I H Q I Q Y G K N A M P A F
AAA GAC AAA TTA AGT ACT GAA GAA ATT CTA GAA GTG GCT GCT TAT < 315
K D K L S T E E I L E V A A Y
ATT TTT CAA AAA GCA GAA AAA GAC TGG TCA AAT CTG GAA AAA GAG < 360
I F Q K A E K D W S N L E K E
GGT TAG < 366
G *
```

**Figura 10. Secuencia de la ORF del gen *petJ-3* de *Nostoc* sp. PCC 7119 y de la proteína citocromo  $c_{6-3}$ .** En verde se señala el péptido de tránsito; en azul, la secuencia codificante de la proteína; en rojo, el codón Stop.



**Figura 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los citocromos  $c_6$ ,  $c_{6-2}$  y  $c_{6-3}$ , de *Nostoc* sp. PCC 7119.** La flecha indica los péptidos de tránsito. Las regiones idénticas están sombreadas en rojo; las similares en rosa y las regiones diferentes en azul. Los residuos responsables del potencial de superficie del Cit  $c_6$  involucrados en las interacciones hidrófobas o electrostáticas con el PS I se encuentran señalados en cajas azules y verdes, respectivamente. El motivo de unión del grupo hemo se encuentra dentro de la caja negra. El rombo señala el residuo clave en la modulación del potencial redox en este tipo de Cit. El triángulo señala a una tirosina muy conservada en los Cit  $c_6$ -like, como el citocromo Cit  $c_{6-2}$ , que no se encuentra conservado ni en el Cit  $c_6$  ni en el Cit  $c_{6-3}$ . Los números de acceso de las secuencias en las bases de datos son los siguientes: Cit  $c_6$ : AJ002361; Cit  $c_{6-2}$ : AM949472 ; Cit  $c_{6-3}$ : HG316543.



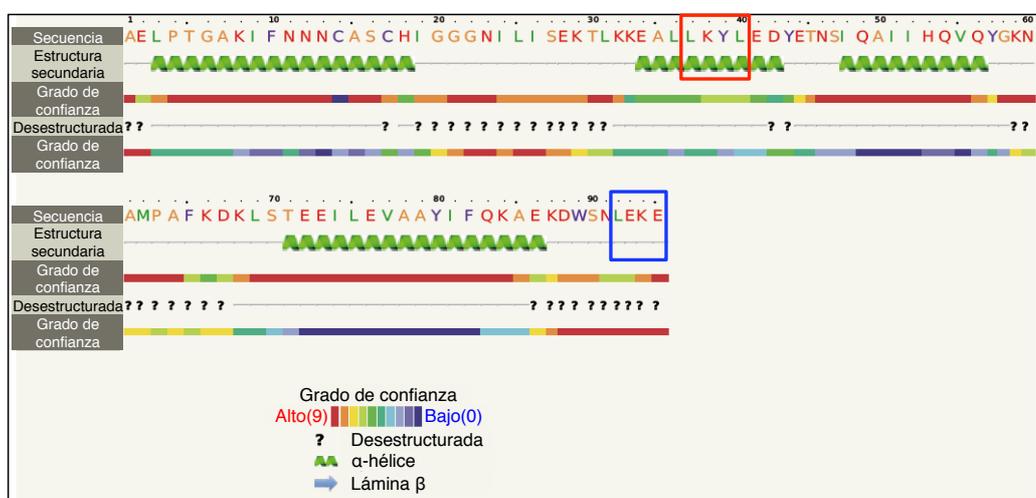
**Figura 12. Predicción del péptido de tránsito del citocromo  $c_{6-3}$ .** Se observa que el péptido de tránsito (en rojo) aparece solo en los primeros 25 aminoácidos. El resto de la proteína se dispondría en una región no citoplásmica (azul). La predicción se realizó utilizando el servidor Phobius.

Siguiendo el análisis de las secuencias (Figura 11), en la posición 54 (según la nomenclatura del Cit  $c_{6-3}$ ), encontramos una glutamina que se ha descrito como clave para establecimiento del potencial rédox [Worral *et al.*, 2007]. La presencia de una glutamina en esta posición, en contraposición a la presencia de isoleucina como ocurre en el Cit  $c_{6-2}$ , hace que el potencial rédox del citocromo sea hasta 100 mV más positivo [Worral *et al.*, 2007]. El Cit  $c_{6-3}$  posee dicha glutamina, así como el Cit  $c_6$  ( $E_{m,7} = +335$  mV) [Molina-Heredia *et al.*, 1998], lo que sugiere un potencial rédox similar entre estas proteínas y diferenciado del Cit  $c_{6-2}$  ( $E_{m,7} = +200$  mV) [Reyes-Sosa *et al.*, 2011], en el que aparece isoleucina en dicha posición.

Los Cit de tipo *c* poseen el grupo hemo unido covalentemente a la cadena polipeptídica a través del dominio consenso CXXCH, en el cual la histidina es uno de los dos ligandos axiales del hierro del grupo hemo. En el Cit  $c_{6-3}$ , la secuencia completa es **CASCH**, idéntica a la del Cit  $c_6$ . En el caso de los Cit  $c_{6-2}$  y  $c_M$ , cuyos potenciales son muy inferiores al del Cit  $c_6$ , la secuencia

consenso es CAGCH. El Cit  $c_{6-3}$  presenta un 55 % y un 41 % de identidad, así como un 68 % y un 56 % de homología con los Cit  $c_6$  y  $c_{6-2}$ , respectivamente. Sin embargo, el Cit  $c_{6-3}$  contiene dos regiones adicionales que no están presentes en los Cit  $c_6$  o  $c_{6-2}$  (Figuras 11 y 13). La primera de ellas constituye una elongación en una  $\alpha$ -hélice central (LKYL) y la segunda se trata de una región C-terminal sin estructura secundaria definida (NLEKE).

El Cit  $c_6$  interacciona con el PS I y con el Cit  $f$  a través de las mismas regiones de la proteína [Molina-Heredia *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2002; Díaz-Moreno *et al.*, 2005a]. La primera está constituida por una superficie hidrófoba, situada alrededor de la región por la cual el grupo hemo está expuesto al solvente, que proporciona una superficie de contacto para la transferencia de electrones. La segunda es una región con carga neta positiva, responsable de dirigir las interacciones electrostáticas a larga distancia con los complejos con los que reacciona.

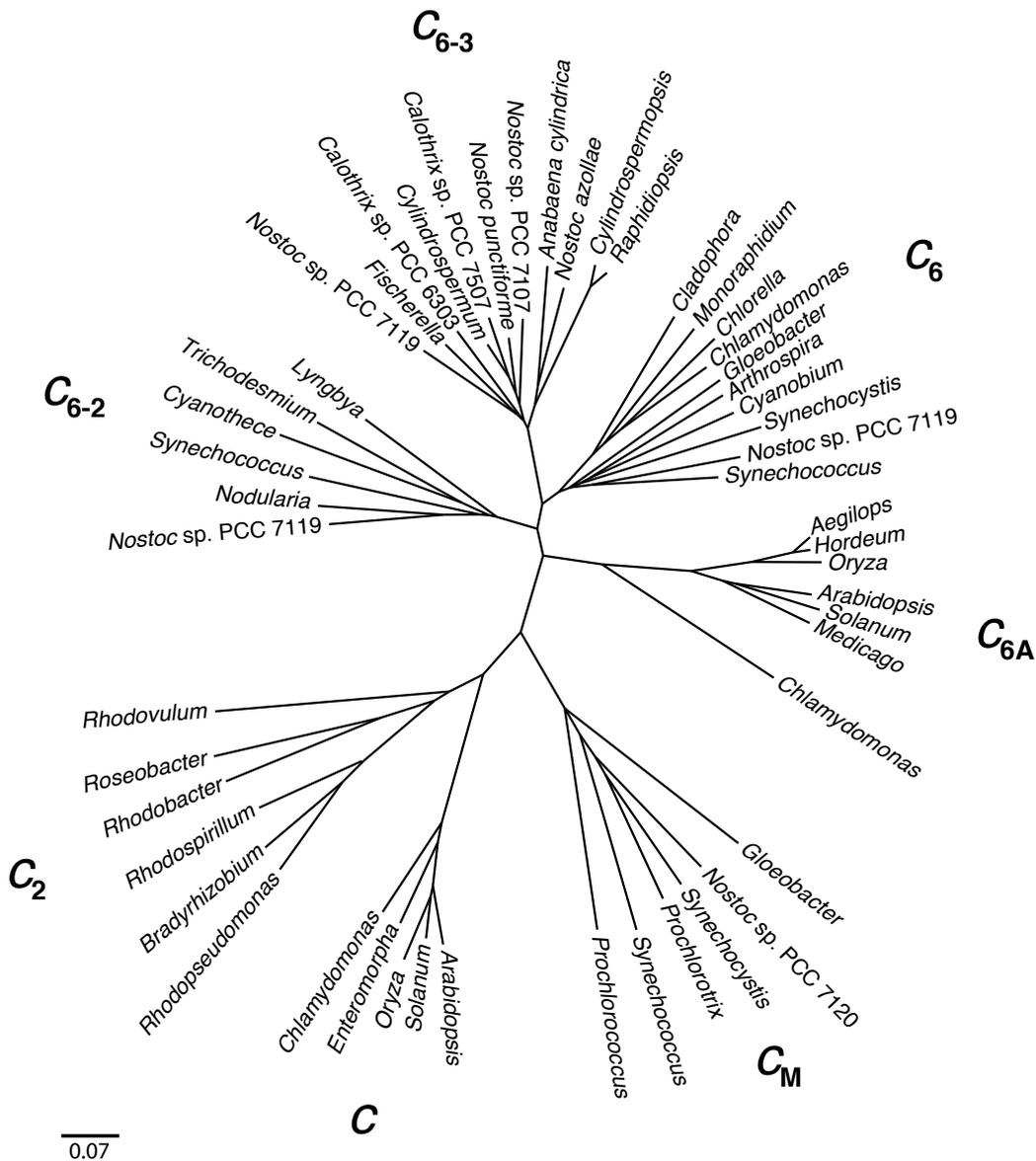


**Figura 13. Predicción de la estructura secundaria del citocromo  $c_{6-3}$ .** Se observa que contiene cuatro hélices  $\alpha$  (lazo verde) unidas entre sí por tres lazos. Las regiones rojas son predicciones con alta probabilidad de confianza, la gradación hacia el azul indica una menor confianza en la estructura modelada a partir de la secuencia. El recuadro rojo y el azul señalan dos inserciones no presentes en los otros citocromos  $c_6$  presentes en *Nostoc* sp. PCC 7119. La predicción se realizó utilizando el servidor Phyre<sup>2</sup>.

El primer sitio se localiza, aproximadamente, entre los residuos 9 y 29 de la proteína madura y el segundo sitio entre el 57 y el 65 [Molina-Heredia *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2002]. Los residuos de la superficie del Cit  $c_6$  implicados en la interacción con el PS I son: I9, S11, N13, L24, V25 y K29, en el sitio hidrófobo, y A57, M58, A60, F61, K62, R64, L56 y K66, en el sitio cargado [Díaz-Moreno *et al.*, 2005a]. Como se observa en la Figura 11, estos residuos también están muy conservados tanto en el Cit  $c_{6-3}$  como en el Cit  $c_{6-2}$ ; de hecho, hay evidencia experimental de que el Cit  $c_{6-2}$  es capaz de interactuar con el PS I, aunque con una eficiencia significativamente menor que el Cit  $c_6$  [Reyes-Sosa *et al.*, 2011]. El hecho de que estas regiones estén conservadas sugiere la posibilidad de que el Cit  $c_{6-3}$  podría interactuar con el Cit  $f$  y quizás también con el PS I. Además, en el Cit  $c_6$  aparece en la posición 64 (68 en el Cit  $c_{6-3}$ ) un residuo de arginina, estrictamente conservado, que es fundamental para la interacción eficiente con el PS I [Molina-Heredia *et al.*, 1999; 2001]. Dicho residuo está presente en el Cit  $c_{6-2}$ , el cual interactúa con el PS I [Reyes-Sosa *et al.*, 2011], pero no se encuentra conservado en el Cit  $c_{6-3}$ , lo que podría indicar que éste último lleva a cabo una función diferente a la del Cit  $c_6$ , respecto a la interacción con el PS I. En cambio, la posición 61 (65 en el Cit  $c_{6-3}$ ) está ocupada por una fenilalanina (Figura 11). Se ha descrito que en los Cit  $c_6$  esa posición siempre está ocupada por fenilalanina o por triptófano (caso de los Cit  $c_{6A}$  presentes en plantas y en algas verdes), en contraste con los Cit  $c_{6-2}$  en los que siempre aparece una tirosina [Bialek *et al.*, 2008].

Para dilucidar el origen filogenético del Cit  $c_{6-3}$  se comparó su secuencia de aminoácidos con la de otros grupos de Cit monohemínicos de tipo  $c$  solubles, con coordinación axial His-Met, presentes en organismos fotosintéticos: Cit  $c_6$  (cianobacterias y cloroplastos de algas verdes), Cit  $c_{6-2}$  (cianobacterias), Cit  $c_{6A}$  (cloroplastos de plantas y algas verdes), Cit  $c_M$  (cianobacterias), Cit  $c_2$  (bacterias anoxigénicas) y Cit  $c$  respiratorio (mitocondrias de algas y plantas). Como se puede ver en la Figura 14, el Cit  $c_{6-3}$  constituye, por sí mismo, un clado diferente e independiente separado de otros Cit similares. Bialek y colaboradores [2008] describieron dos grupos bien definidos de Cit  $c_{6-2}$ , a los

que denominaron Cit  $c_{6B}$  y  $c_{6C}$ , que no aparecen de forma simultánea en una misma cianobacteria. Mientras que el Cit  $c_{6-2}$  de *Nostoc* pertenece al grupo de los Cit  $c_{6C}$ , como se ha mencionado antes, el Cit  $c_{6-3}$  constituye un nuevo grupo de Cit de tipo  $c$ , no descrito hasta ahora, que sólo aparece en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.

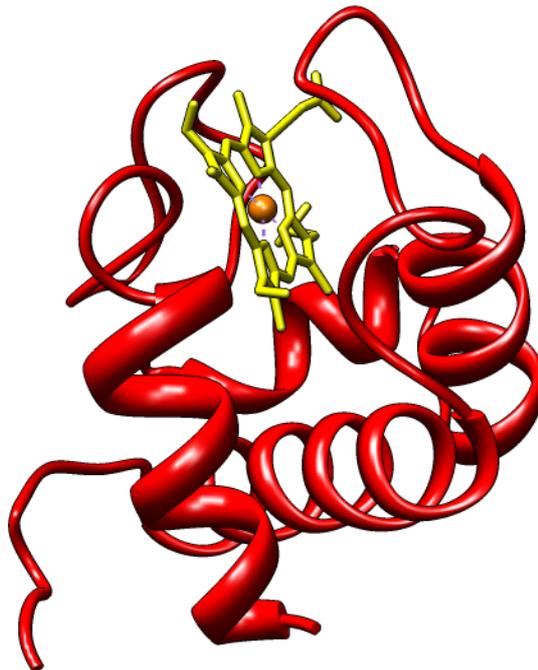


**Figura 14. Árbol filogenético de los diferentes citocromos de tipo  $c$  solubles, con coordinación Histidina-Metionina, presentes en organismos fotosintéticos.** El árbol se diseñó siguiendo el algoritmo de máxima verosimilitud usando el software PROTML (MOLPHY) [Adachi y Hasegawa, 1992]. Se alinearon las siguientes secuencias: Cit  $c_{6-3}$  ( $c_{6-3}$ ) de *Anabaena cylindrica* PCC 7122 (GenBank gi 440681468),

*Calothrix* sp. PCC 6303 (GenBank gi 428297476), *Calothrix* sp. PCC 7507 (GenBank gi 427719567), *Cylindrospermopsis raciborskii* (GenBank gi WP\_006276584.1), *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417 (GenBank gi 434404902), *Fischerella* sp. JSC-11 (GenBank gi 497072149), *Nostoc azollae* 0708 (GenBank gi 298490297), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (GenBank gi 186683068), *Nostoc* sp. PCC 7107 (GenBank gi 427710665), *Nostoc* sp. PCC 7119 (TrEMBL HG316543) y *Raphidiopsis brookii* (GenBank gi WP\_009344415.1); Cit  $c_6$  ( $c_6$ ) de *Arthrospira platensis* NIES-39 (GenBank gi YP\_005072220.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank gi 117924), *Chlorella vulgaris* (GenBank gi 30578153), *Cladophora glomerata* (GenBank gi 24636293), *Cyanobium* sp. PCC 7001 (GenBank gi 493967399), *Gloeobacter violaceus* (GenBank gi 37521549), *Monoraphidium braunii* (GenBank gi 729268), *Nostoc* sp. PCC 7119 (EMBL AJ002361), *Synechococcus elongatus* (GenBank gi 25014058) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (EMBL P46445); Cit  $c_{6A}$  ( $c_{6A}$ ) de *Aegilops speltoides* (GenBank gi 11222607), *Arabidopsis thaliana* (GenBank gi 9783643), *Chlamydomonas reinhardtii* (C\_820065), *Hordeum vulgare* (GenBank gi 16311393), *Medicago truncatula* (GenBank gi 11610049), *Oryza sativa* (GenBank gi 8955747) y *Solanum tuberosum* (GenBank gi 13615108); Cit  $c_M$  ( $c_M$ ) de *Gloeobacter violaceus* (GenBank gi 37522351), *Nostoc* sp. PCC 7120 (gi 17228860), *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* CCMP1378 (GenBank gi 33861613), *Prochlorothrix hollandica* (GenBank gi 4098525), *Synechococcus* sp. WH 8102 (GenBank gi 33865254) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GenBank gi 16330764); Cit  $c$  respiratorio ( $c$ ) de *Arabidopsis thaliana* (GenBank gi 16177), *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank gi 322374), *Enteromorpha intestinalis* (GenBank gi 65520), *Oryza sativa* (GenBank gi 2394300), *Solanum tuberosum* (GenBank gi 65506); Cit  $c_2$  ( $c_2$ ) de *Bradyrhizobium* sp. ORS278 (TrEMBL Q8VUB4), *Rhodobacter capsulatus* (TrEMBL P00094), *Rhodospseudomonas palustris* (TrEMBL Q8GI80), *Rhodospirillum centenum* (TrEMBL P81153), *Rhodovulum sulfidophilum* (TrEMBL Q93I63) y *Roseobacter denitrificans* (TrEMBL P07625); y Cit  $c_{6-2}$  ( $c_{6-2}$ ) de *Cyanothece* sp. CCY0110 (GenBank gi 126660190), *Lyngbya* sp. PCC 8106 (GenBank gi 119484682), *Nodularia spumigena* CCY9414 (GenBank gi 119509989), *Nostoc* sp. PCC 7119 (EMBL AM902496), *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (GenBank gi 56751577) y *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (GenBank gi 113478003). La longitud de las ramas reflejan el número estimado de sustituciones por sitio.

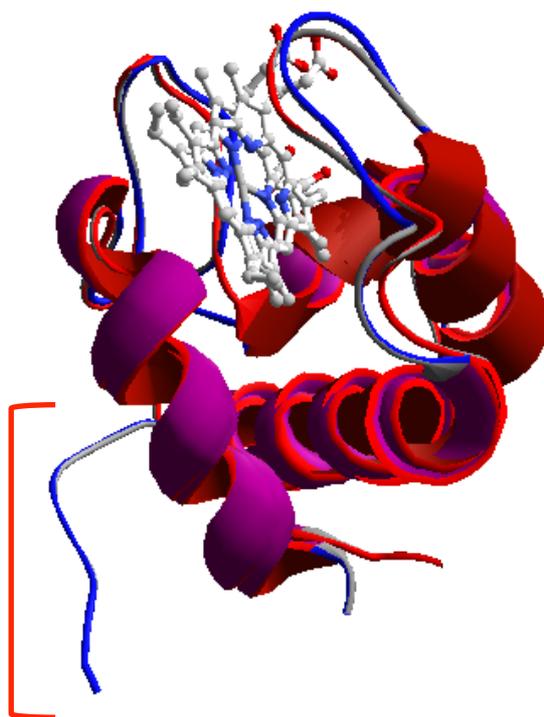
#### 4.1.3. Modelo estructural del citocromo $c_{6-3}$

En el apartado anterior se realizó el análisis de la estructura primaria y secundaria del Cit  $c_{6-3}$  en el que se observó que el Cit  $c_{6-3}$  tiene conservadas las regiones de interacción de la proteína con el Cit  $f$  y con el PS I. Ahora bien, no sólo es importante la homología a nivel de secuencia, sino que también lo es la localización tridimensional de estos aminoácidos conservados, ya que las proteínas interaccionan entre sí mediante superficies de contacto. Por ello, se realizó una colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Marta Martínez Júlvez para resolver la estructura cristalográfica de la proteína. Sin embargo, a fecha de finalización de esta tesis, aún no se ha podido resolver la estructura cristalográfica, por lo que se realizó un modelado tridimensional de la estructura del Cit  $c_{6-3}$  mediante *threading* (Figura 15).



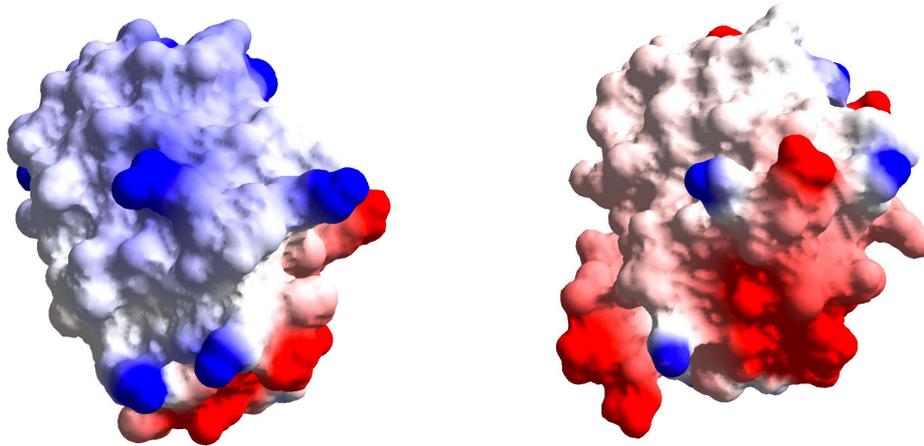
**Figura 15. Modelo tridimensional de la estructura del citocromo  $c_{6-3}$ .** Modelado mediante *threading* utilizando el servidor *Phyre*<sup>2</sup>. Las coordenadas del grupo hemo se modelaron a partir de la estructura del Cit  $c_6$  [código PDB [4GYD](#), Díaz-Moreno *et al.*, 2014]. Para la visualización del *cartoon* se utilizó el software Chimera. En amarillo se observa el grupo hemo y en naranja el átomo de hierro.

Para poder analizar el grado de homología tridimensional entre el Cit  $c_6$  y el Cit  $c_{6-3}$  se hizo una superposición de ambos modelos (Figura 16). En ella observamos que la homología estructural es elevada, encontrando diferencias fundamentalmente en las regiones únicas del Cit  $c_{6-3}$ , correspondientes a la elongación de la  $\alpha$ -hélice y a una región C-terminal. Sin embargo, esta última región C-terminal aparece desordenada, ya que no se pudo modelar de manera fiable.



**Figura 16. Superposición de los modelos estructurales de los citocromos  $c_6$  y  $c_{6-3}$ .** En rojo se representa el Cit  $c_6$  y en azul el Cit  $c_{6-3}$ . Están orientados con el sitio de interacción hidrófobo en la parte superior y con el electrostático de frente. El recuadro rojo señala la región desordenada C-terminal del Cit  $c_{6-3}$  que no se ha podido modelar de forma fiable.

A partir del modelo de la estructura tridimensional del Cit  $c_{6-3}$  se estimó el potencial electrostático de superficie. A pesar de que ambas estructuras son muy similares (Figura 16), muestran una gran disparidad en el potencial electrostático de superficie (Figura 17).



**Figura 17. Comparación de los potenciales electrostáticos de superficie de los citocromos  $c_6$  y  $c_{6-3}$ .** Los citocromos  $c_6$  (izquierda) y  $c_{6-3}$  (derecha) están orientados con el sitio de interacción hidrófobo en la parte superior y con el electrostático de frente. En rojo se muestran las zonas de la superficie con carga neta negativa y en azul las que presentan carga neta positiva.

Como se ha mencionado anteriormente, el Cit  $c_6$  de *Nostoc* posee dos zonas mediante las cuales interacciona tanto con el PS I como con el Cit  $f$  [Molina-Heredia *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2002; Díaz-Moreno *et al.*, 2005a]. La primera es un área con carga neta positiva, responsable de las interacciones electrostáticas a larga distancia y de la formación de un complejo electrostático transitorio con el PS I y el Cit  $f$ . La segunda zona correspondería a una superficie hidrófoba alrededor del área en la que el grupo hemo es accesible al solvente, responsable de la formación de una interfase de contacto con el PS I y el Cit  $f$ , que permite que los electrones se transfieran de un centro redox al otro [Molina-Heredia *et al.*, 1999; Crowley *et al.*, 2002; Díaz-Moreno *et al.*, 2005a]. El Cit  $c_{6-3}$  conserva la región hidrófoba pero no la superficie de interacción electrostática que dirige las interacciones entre proteínas a larga distancia (Figura 17), lo cual hace presagiar que a baja fuerza iónica es probable que sea un donante de electrones al PS I muy ineficiente.

#### 4.1.4. Expresión y purificación del citocromo $c_{6-3}$

Para expresar y purificar el Cit  $c_{6-3}$  en *E. coli*, se construyó el vector de expresión pEAC63 (Figura 9).

Al estar presente el péptido de tránsito que enviaría la proteína al lumen tilacoidal de la cianobacteria, el Cit  $c_{6-3}$  se expresó en el espacio periplásmico de *E. coli* (compartimento celular equivalente al lumen tilacoidal y al espacio periplásmico de cianobacterias). Así pues, para su expresión tiene que producirse una maduración postraducciona que incluya: 1) la secreción de la proteína y del grupo hemo al periplasma, 2) el corte endoproteolítico del péptido de tránsito, y 3) la unión covalente del grupo hemo a la proteína. Para esto en *E. coli* es fundamental la actividad de una serie de genes cuyos productos se requieren para la maduración de los Cit de tipo *c* [Thöny-Meyer *et al.*, 1995]. Dichos genes, denominados *ccmA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* y *H*, se encuentran en el operón *aeg46.5* y se inducen en condiciones de anaerobiosis [Thöny-Meyer *et al.*, 1995]. Estos genes codifican para un transportador de tipo ABC [Thöny-Meyer *et al.*, 1995; Kranz *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1998], para una tiorredoxina periplásmica [Fabianek *et al.*, 1998], para una chaperona de hemo [Schulz *et al.*, 1998] y para una posible hemo-liasa [Thöny-Meyer *et al.*, 1995; Kranz *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1998].

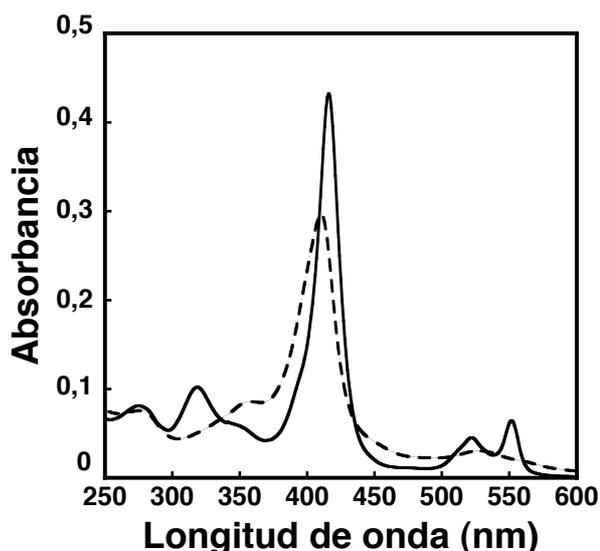
Para expresar el Cit  $c_{6-3}$  de *Nostoc* en *E. coli* se ensayaron condiciones aeróbicas, microaeróbicas y anaeróbicas; distintos medios de cultivo, temperaturas y tiempos de cultivo; inducción por IPTG, e incluso se co-expresaron los genes *ccmABCDEFGH*. El primer paso fue escoger una estirpe de *E. coli* adecuada para la producción del Cit, dado que distintas estirpes pueden presentar unos niveles de expresión de proteínas heterólogas muy diferentes. La estirpe seleccionada fue la MC106, al igual que ocurre en la producción de los Cit  $c_6$  del mismo organismo, ya que produce un alto rendimiento en la producción de Cit, según los datos del grupo previos a este estudio. El Cit  $c_{6-3}$  se co-expresó con el plásmido pEC86, un vector que

expresa constitutivamente los genes *ccmABCDEFGH* [Arslan *et al.*, 1998] para la maduración y correcta expresión de citocromos en el espacio periplásmico de *E. coli*. En las condiciones óptimas utilizadas, descritas en Materiales y Métodos, los rendimientos volumétricos de la expresión de la proteína en el espacio periplásmico fueron de aproximadamente 25 mg de Cit  $c_{6-3}$  por litro de cultivo, a pequeña escala (100 ml aprox.); estos rendimientos bajaban considerablemente al escalar los cultivos hasta volúmenes de decenas de litros, siendo entonces de 2,7 mg de Cit  $c_{6-3}$  por litro de cultivo.

Para la purificación de la metaloproteína expresada en *E. coli* se extrajo la fracción periplásmica (ver apartado de Materiales y Métodos), de esta forma se obtenía una solución acuosa de la metaloproteína a purificar. Partiendo de una pequeña producción de unos 15 mg, se procedió a realizar una cromatografía en una columna de intercambio aniónico, para posteriormente concentrar las muestras enriquecidas y realizar una cromatografía de exclusión molecular. Finalmente se obtuvieron 9,4 mg de Cit  $c_{6-3}$  con una relación de pureza  $A_{275}/A_{552}$  de 1,17, prácticamente puro a homogeneidad electroforética.

#### 4.1.5. Caracterización físico-química del citocromo $c_{6-3}$

Tras conseguir una cantidad de Cit  $c_{6-3}$  suficiente y de una pureza considerable, se comenzó la caracterización de la proteína. Primero se realizó el espectro UV/Vis de la proteína en sus formas reducida y oxidada (Figura 18). Tras realizar el espectro de la proteína 100 % reducida, se añadió una cantidad equimolecular de persulfato amónico para oxidarla. En su estado reducido, el Cit  $c_{6-3}$  presenta unos máximos característicos de absorbancia a 552 (banda  $\alpha$ ), 522 (banda  $\beta$ ), 416 (banda  $\gamma$  o Soret), 319 (banda  $\delta$ ) y 275 nm (proteína). Tras su oxidación, las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  desaparecen y se observa otra más amplia a 528 nm, la banda Soret se desplaza hasta los 410 nm, la banda  $\delta$  desaparece y surge un nuevo máximo a 358 nm.



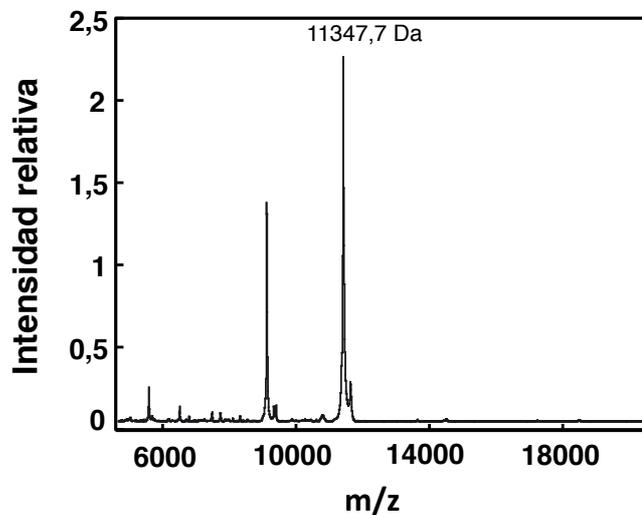
**Figura 18. Espectro de absorción UV/Vis del citocromo  $c_{6-3}$  de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Se representa el espectro reducido (línea continua) y el espectro oxidado (línea discontinua). El Cit  $c_{6-3}$  oxidado con cristales de persulfato amónico.

Posteriormente, se determinó el coeficiente de extinción milimolar del Cit  $c_{6-3}$  a 552 nm para poder cuantificar exactamente la concentración de proteína en la muestra. Para ello, se siguió el método del piridin-hemocromo, según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, obteniendo como resultado que el coeficiente de extinción para el Cit  $c_{6-3}$  a 552 nm era de **24,8  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$** , en su estado reducido, y que el diferencial del espectro reducido-oxidado era de **16,63  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$** .

La masa molecular se determinó por espectrometría de masas (MALDI-TOF), dando como resultado un tamaño de **11 347,7 Da** (Figura 19).

También se determinó el punto isoeléctrico ( $pI$ ) del Cit  $c_{6-3}$ . En relación a esto no hay que olvidar que el  $pI$  del Cit  $c_6$ , y de su homólogo funcional la Pc, presentan una enorme variación de un organismo a otro, pero son muy similares dentro de un mismo organismo [De la Rosa *et al.*, 2002]. Así, en *Nostoc* sp. PCC 7119, el Cit  $c_6$  y la Pc son proteínas básicas, con  $pI$  de 9,0 y

8,8 respectivamente [Molina-Heredia *et al.*, 1998]. En cambio, el pI del Cit  $c_{6-3}$  es 5,2, significativamente diferente al de Cit  $c_6$  y Pc.



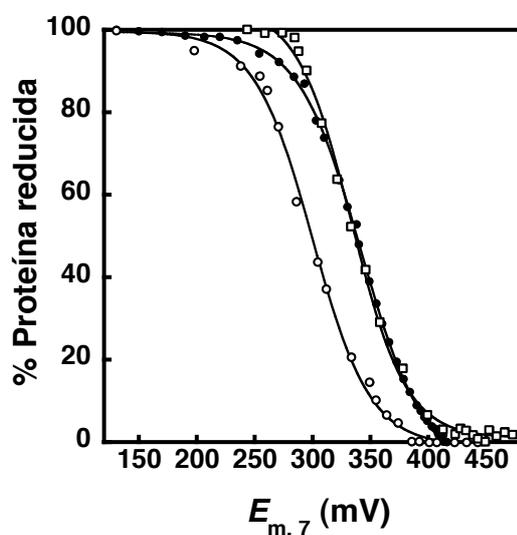
**Figura 19. Análisis por MALDI-TOF del citocromo  $c_{6-3}$  de *Nostoc sp.* PCC 7119 expresado en *E. coli*.** El espectro muestra múltiples especies cargadas, así como varios picos que representan distintos estados cargados de la misma molécula, quedando el pico de mayor intensidad como el valor de peso molecular final.

Para comprobar que *E. coli* era capaz de madurar correctamente el Cit  $c_{6-3}$ , se secuenció el extremo N-terminal de la proteína según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. La secuencia obtenida fue: **AELP**.

La localización celular del Cit  $c_{6-3}$  es un punto clave a tener en cuenta a la hora de poder asignarle una posible función fisiológica. En este contexto, la estrecha similitud entre los péptidos de tránsito de los Cit  $c_6$  y  $c_{6-3}$  y el hecho de que *E. coli* sea capaz de reconocer ambos péptidos y de mandar a ambas proteínas al espacio periplásmico (compartimento equivalente al lumen tilacoidal y al espacio periplásmico de cianobacterias) correctamente procesadas implica que, probablemente, en *Nostoc* el Cit  $c_{6-3}$  se co-localice con el Cit  $c_6$ .

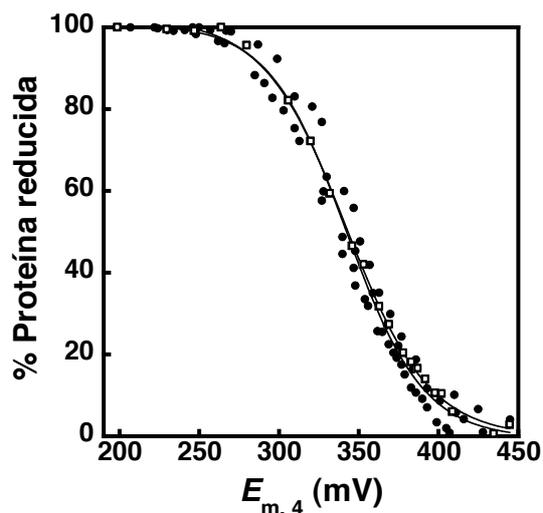
En *Nostoc sp.* PCC 7119 el Cit  $c_6$ , cuyo  $E_{m,7}$  es +335 mV [Molina-Heredia *et al.*, 1998], toma los electrones del Cit  $f$ , cuyo  $E_{m,7}$  es +334 mV [Albarrán *et al.*, 2005] y los dona al PS I, cuyo  $E_{m,7}$ , en su estado fotooxidado, es de +500 mV

[Brettell, 1997]. El  $E_{m,7}$  del Cit  $c_{6-3}$  de *Nostoc* es  $+300 \pm 6$  mV, unos 35 mV inferior al de los Cit  $c_6$  y  $f$  (Figura 20).



**Figura 20. Titulación potenciométrica redox de los citocromos  $f$ ,  $c_6$  y  $c_{6-3}$  a pH 7,0.** Se presenta la titulación reductiva del Cit  $f$  (círculos negros), del Cit  $c_6$  (cuadrados blancos) y del Cit  $c_{6-3}$  (círculos blancos). El ajuste para cada caso a la ecuación de Nernst para un electrón se representa como una línea continua.

Estas medidas han sido realizadas a pH 7,0, pero ese no sería el pH fisiológico del lumen tilacoidal, en el cual estas proteínas llevarían a cabo su función. Está descrito que al disminuir el pH el potencial redox de algunos Cit puede volverse mas positivo [Roncel *et al.*, 2003]; por ello, también se han realizado las medidas a un pH 4,0, mas próximo al fisiológico en condiciones de iluminación [Kramer *et al.*, 1999]. El  $E_{m,4}$  del Cit  $c_{6-3}$  es +343 mV en estas condiciones, igual que el del Cit  $c_6$  ( $E_{m,4}$  también +340 mV) siendo, por tanto, ambas proteínas isopotenciales a este pH (Figura 21). Lamentablemente, no fue posible realizar la titulación para el caso del Cit  $f$ , debido a que la proteína se desnaturizaba a pH 4,0 (el Cit  $f$  forma parte de un macrocomplejo de membrana, por lo que en condiciones fisiológicas no se encuentra la forma trunca soluble). Por lo tanto, y desde un punto de vista termodinámico, el Cit  $c_{6-3}$  sería capaz de captar electrones del Cit  $f$ .



**Figura 21. Titulación potenciométrica rédox de los citocromos  $c_6$  y  $c_{6-3}$  a pH 4,0.** Se presenta la titulación reductiva del Cit  $c_6$  (puntos negros) y del Cit  $c_{6-3}$  (cuadrados blancos). El ajuste a la ecuación de Nernst para un electrón para cada caso se representa como una línea continua.

Las características físico-químicas estudiadas se resumen en la Tabla 10.

**Tabla 10. Características físico-químicas del citocromo  $c_{6-3}$  de *Nostoc* sp. PCC 7119.**

Proteína	$E_{m,7}$ (mV)	$E_{m,4}$ (mV)	$\epsilon_{552}$ ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Peso molecular (Da)	pI	N-terminal
Cit $c_{6-3}$	+300	+343	24,8	11 347	5,2	AELP

#### 4.1.6. Análisis funcional del citocromo $c_{6-3}$

Debido a que el Cit  $c_{6-3}$  es similar al Cit  $c_6$ , tanto en potencial como en la posible localización subcelular, se estudió si las dianas de interacción del Cit  $c_{6-3}$  podrían ser similares a las del Cit  $c_6$ . El esquema general funcional del Cit  $c_6$  implica una transferencia electrónica desde el complejo Cit  $b_6-f$  hasta el PS I o hasta las oxidasas terminales (Figura 3), por lo que se analizaron, para el caso del Cit  $c_{6-3}$ , todas estas posibles dianas de interacción.

#### 4.1.6.1. Interacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y el citocromo $f$

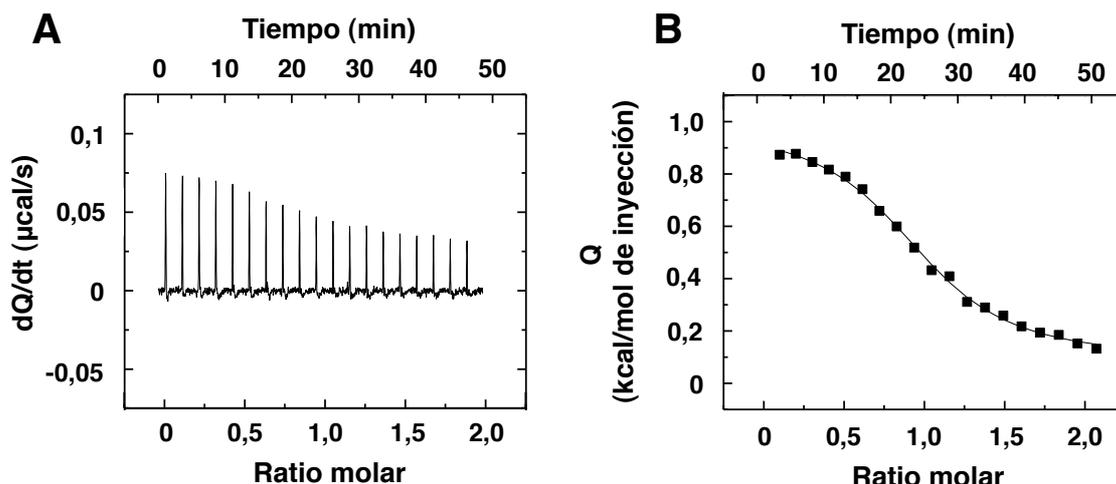
A pesar de saber que los citocromos Cit  $c_6$  y Cit  $c_{6-3}$  son isotenciales en condiciones de pH fisiológico y de que los residuos implicados en la interacción del Cit  $c_6$  con el Cit  $f$  están conservados en el Cit  $c_{6-3}$ , estos datos no son suficientes para establecer una posible interacción del Cit  $c_{6-3}$  con el Cit  $f$ . Por ello, el primer objetivo funcional fue la caracterización de la interacción entre el Cit  $c_{6-3}$  y el Cit  $f$  mediante calorimetría de titulación isoterma y *docking* molecular.

##### 4.1.6.1.1. Calorimetría de titulación isotérmica

Se procedió a analizar la interacción entre el Cit  $c_{6-3}$  y el Cit  $f$  mediante calorimetría de titulación isotérmica, utilizando el Cit  $c_6$  como control de una interacción eficiente (Figura 22). Esta técnica permite detectar los pequeños cambios de calor que se producen al interaccionar dos elementos; en caso de no existir interacción, no se producirían esas variaciones. Al realizar dicho análisis, se concluyó que el Cit  $c_{6-3}$ , al igual que el Cit  $c_6$ , es capaz de interaccionar de forma eficiente con el Cit  $f$  en las condiciones ensayadas. Los datos extraídos a partir de las cinéticas de unión, ajustados para un modelo de unión de un ligando, sin cooperatividad, permitió estimar los valores de unión estequiométrica, la  $K_A$  y la entalpía y entropía de unión para el proceso de interacción (Tabla 11).

**Tabla 11. Propiedades termodinámicas de la calorimetría de los complejos citocromo  $c_6$ /citocromo  $f$  y citocromo  $c_{6-3}$ /citocromo  $f$ .**  $K_A$ : constante de asociación;  $\Delta H$ : entalpía de unión;  $\Delta G$ : energía libre;  $-T\Delta S$ : entropía de unión;  $n$ : estequiometría de unión;  $K_D$ : constante de disociación.

Proteína	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	$n$	$K_D$ ( $\mu M$ )
Cit $c_6$	$7,8 \cdot 10^4$	-14,64	-27,91	-13,26	1,10	13,0
Cit $c_{6-3}$	$5,0 \cdot 10^5$	3,76	-32,22	-35,99	0,99	2,0



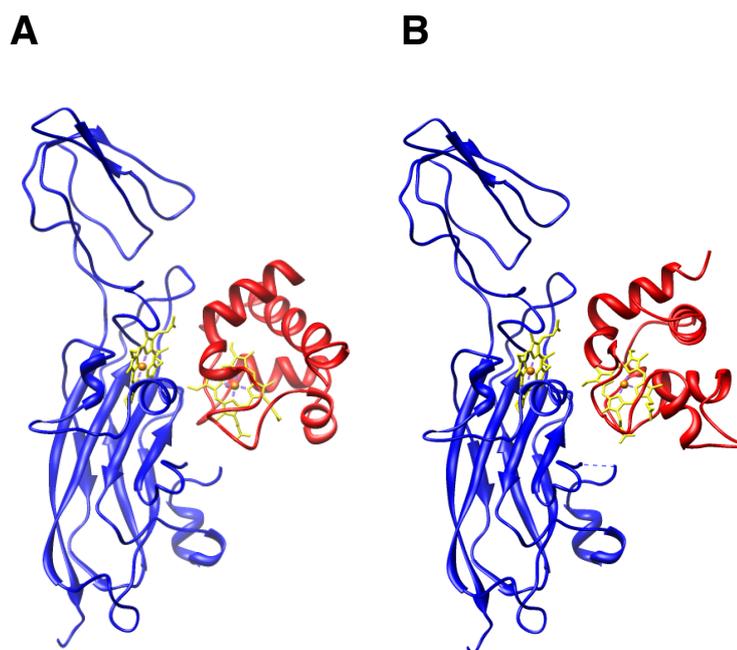
**Figura 22. Calorimetría de titulación isotérmica del complejo citocromo  $c_{6-3}$ /citocromo  $f$ .** (A) Termograma de la titulación en el que se observa una correlación entre la cantidad de Cit  $c_{6-3}$  añadido (ratio molar) y un desprendimiento de calor ( $dQ/dt$ ); (B) Ajuste de la isoterma de unión a un modelo de sitio único.

#### 4.1.6.1.2. *Docking* molecular entre el citocromo $c_{6-3}$ y el citocromo $f$

Aunque por microcalorimetría se concluye que el Cit  $c_{6-3}$  interacciona con el Cit  $f$ , no se puede afirmar con total seguridad que dicha interacción conduzca a la transferencia electrónica entre ambos. Esto es debido a que la interacción podría ocurrir por zonas de la proteína que no sean las adecuadas para la transferencia de electrones entre los grupos hemo. Por ello, se procedió a analizar la interacción entre el Cit  $c_{6-3}$  y el Cit  $f$  mediante *docking* molecular.

El *docking* molecular se basa en la predicción de la conformación de una proteína al estar unida a otra, formando un complejo estable de mínima energía. Para ello hay diferentes algoritmos que alinean las proteínas siguiendo diferentes parámetros, como la complementariedad geométrica, incluyendo la complementariedad en la superficie molecular. También pueden acoplar en función de determinados rasgos hidrófobos o electrostáticos. Uno es esos algoritmos, que es el utilizado para el análisis de este trabajo, realiza una

estimación equilibrada de estos valores y devuelve una conformación de interacción de mínima energía. Así pues se realizó un modelado con este algoritmo (usando *Cluspro* V.2.0.) del complejo Cit  $c_{6-3}$ /Cit *f* y, como control, del complejo Cit  $c_6$ /Cit *f* (Figura 23).

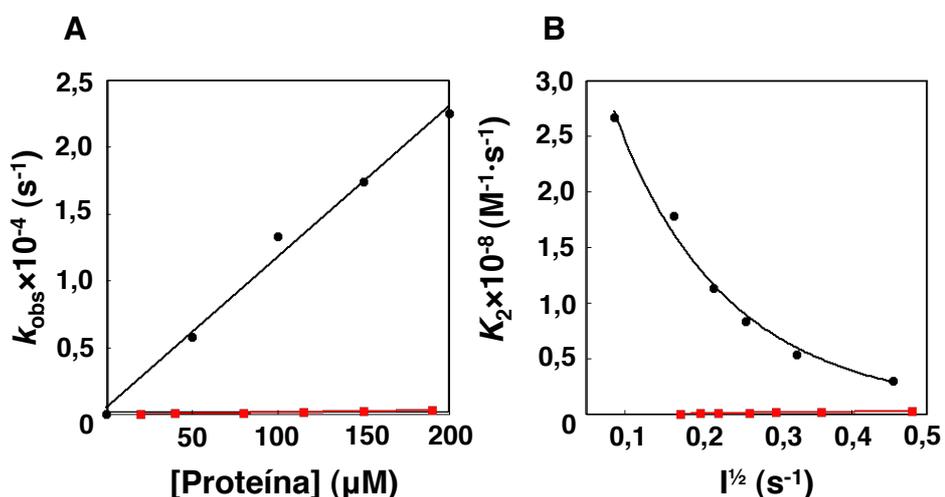


**Figura 23. Docking molecular de la interacción entre citocromo  $c_6$ /citocromo *f* y citocromo  $c_{6-3}$ /citocromo *f*.** Se presentan los modelados del complejo Cit  $c_6$ /Cit *f* [A] y Cit  $c_{6-3}$ /Cit *f* [B], escogiendo los modelos equilibrados de mínima energía para cada caso.

Como se observa en la Figura 23, el Cit  $c_{6-3}$  interacciona con el Cit *f* en una orientación propicia para la transferencia de electrones, similar a la descrita por Díaz-Moreno y colaboradores [2005b] para el complejo Cit  $c_6$ /Cit *f*. Por ello, se puede concluir que el Cit  $c_{6-3}$  interacciona con el Cit *f*, con una orientación adecuada para la transferencia de electrones.

#### 4.1.6.2. Interacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y el PS I

La siguiente diana de interacción que se probó fue el PS I. Para realizar este análisis se realizaron experimentos de cinéticas rápidas inducidas por láser. Esta técnica consiste en la oxidación del PS I, mediante un pulso de luz láser, y la posterior medición de la reducción del PS I por el donador elegido en la escala del microsegundo al segundo. Estos experimentos permiten discriminar entre donadores específicos, que presentarán cinéticas rápidas, e inespecíficos, que tendrán unas cinéticas lentas. Como se observa en la Figura 24A, la transferencia de electrones desde el Cit  $c_{6-3}$  al PS I es muy lenta comparada con la del Cit  $c_6$ .



**Figura 24. Transferencia electrónica desde los citocromos  $c_6$  y  $c_{6-3}$  al fotosistema I.** Se presentan los valores de transferencia de Cit  $c_6$  (puntos negros) y  $c_{6-3}$  (cuadrados rojos) respecto a la concentración de proteína (A) y a la dependencia de fuerza iónica (B), indicando una ineficiencia del Cit  $c_{6-3}$  en la interacción con el PS I.

La  $k_{bim}$  para la reducción del PS I por parte del Cit  $c_{6-3}$  es de 75 veces inferior a la del Cit  $c_6$  (Tabla 12). Además, las cinéticas dependientes de fuerza iónica (Figura 24B) sólo refuerzan los datos de baja reactividad del Cit  $c_{6-3}$  con el PS I, ya que incluso a muy alta fuerza iónica no llega nunca a equipararse con el Cit  $c_6$ . Con toda la información obtenida de este experimento concluimos que el Cit

$c_{6-3}$  sería incapaz de interactuar de forma eficiente con el PS I de *Nostoc* sp. PCC 7119.

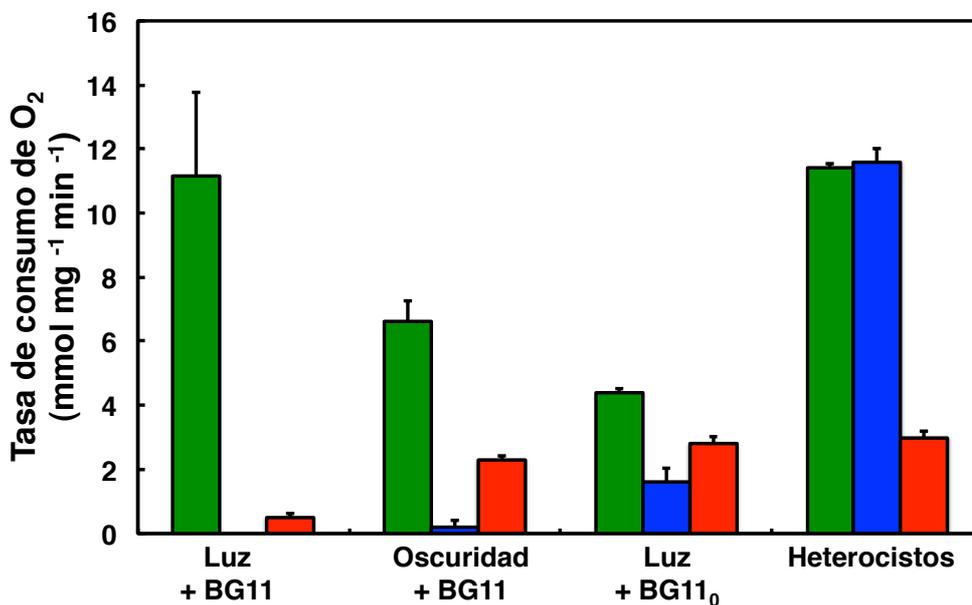
**Tabla 12. Valores cinéticos para la transferencia electrónica desde los citocromos  $c_6$  y  $c_{6-3}$  al fotosistema I.**  $k_{bim}$ : constante bimolecular de segundo orden de la reacción;  $k_{inf}$ : constante bimolecular extrapolada a fuerza iónica infinita;  $k_{ET}$ : constante de primer orden de transferencia electrónica.

Proteína	$k_{bim} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-7}$	$k_{inf} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-6}$	$k_{ET} (s^{-1}) \times 10^{-5}$
Cit $c_6$	12,1	11,4	1,7
Cit $c_{6-3}$	0,16	2,5	-

#### 4.1.6.3. Reacción entre el citocromo $c_{6-3}$ y las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3

Siguiendo el esquema de la Figura 3, descartaríamos el posible transporte de electrones a través del Cit  $c_{6-3}$  desde el Cit  $b_6-f$  hasta el PS I. Sin embargo, el Cit  $c_{6-3}$  podría transportar electrones hasta las oxidasas terminales respiratorias como está descrito que realiza el Cit  $c_6$  [Navarro *et al.*, 2005]. Para comprobar esto, se analizaron las tasas de consumo de oxígeno de membranas enriquecidas en oxidasas terminales respiratorias en presencia de Cit  $c_{6-3}$  purificado. Como control positivo se utilizó el Cit  $c_6$  y como control negativo, de interacción inespecífica, se utilizó el Cit  $c$  respiratorio de caballo. *Nostoc* sp. PCC 7119 crece fotoautótrofamente, pero también puede crecer quimiotróficamente en oscuridad, en ambos casos en presencia de nitrógeno combinado o dinitrógeno como fuente de nitrógeno [Pils *et al.*, 2004]. Así mismo, en este organismo hay diferentes oxidasas en función del tipo celular, teniendo las denominadas Cox1 exclusivamente en células vegetativas y las oxidasas Cox2 y Cox3 exclusivamente en heterocistos [Pils *et al.*, 2004; Valladares *et al.*, 2007]. Por ello, se ha estudiado la actividad respiratoria a través del consumo de oxígeno en membranas extraídas de cultivos en oscuridad (con fructosa en el medio) y en presencia de luz. De esta última

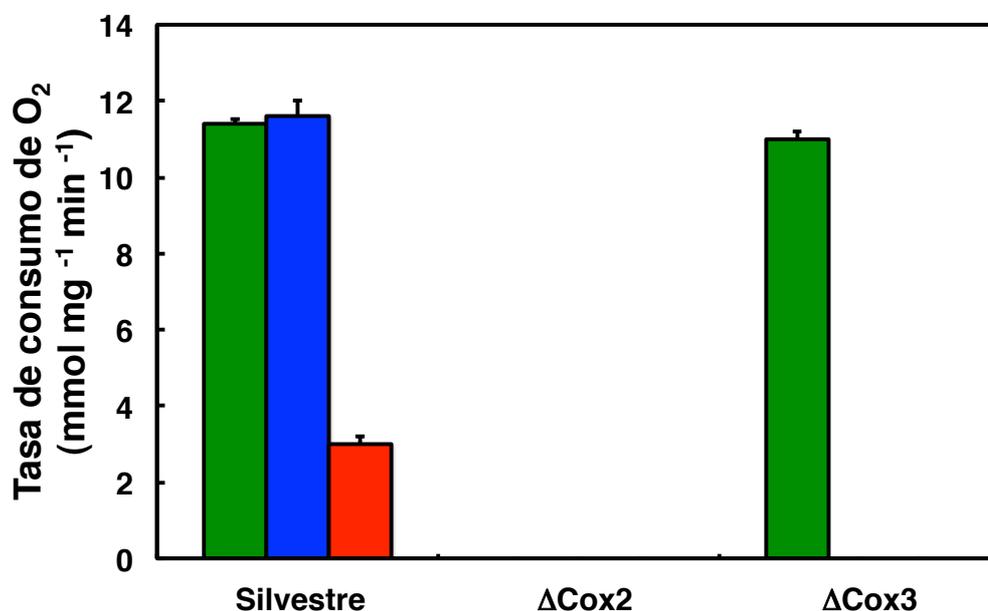
condición, se han extraído membranas de células totales en medio BG11 completo y membranas de células totales en medio BG11<sub>0</sub> sin nitrógeno combinado. Además, a partir de estos cultivos en luz y sin nitrógeno combinado, se procedió a hacer un aislamiento de heterocistos y se extrajeron membranas de este tipo celular para su análisis. Como se muestra en la Figura 25, mientras que el Cit  $c_6$  reacciona eficientemente con todas las preparaciones ensayadas, el Cit  $c_{6-3}$  sólo lo hace con las membranas obtenidas de heterocistos aislados.



**Figura 25. Reacción del citocromo  $c_{6-3}$  con las oxidasas terminales de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Tasas de consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_6$  (Verde), Cit  $c_{6-3}$  (Azul) o de Cit  $c$  de caballo (Rojo) con membranas extraídas en las siguientes condiciones: luz con medio BG11 completo (Luz + BG11); oscuridad con medio BG11 completo (Oscuridad + BG11); luz con medio BG11<sub>0</sub> sin nitrógeno combinado (Luz + BG11<sub>0</sub>); de esta última condición, se realizó un aislamiento de heterocistos y posteriormente se hizo una extracción de membranas de estas células (Heterocistos). Las barras de error se calcularon a partir de la media de tres réplicas.

Como hemos mencionado antes, en los heterocistos se encuentran las oxidasas exclusivas de este tipo celular, la Cox2 y Cox3, oxidasas de tipo hemo-cobre [Valladares *et al.*, 2007]. Para discriminar qué oxidasas son las

que intervienen en el proceso, se realizaron nuevos análisis del consumo de oxígeno en mutantes de delección de estas oxidasas (cedidos por el laboratorio de Enrique Flores y Antonia Herrero, del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y CSIC).



**Figura 26. Reacción del citocromo  $c_{6-3}$  con mutantes de las oxidasas terminales de heterocistos de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Tasas de consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_6$  (Verde), Cit  $c_{6-3}$  (Azul) o de Cit  $c$  de caballo (Rojo) con membranas extraídas de heterocistos silvestres (Silvestre), de mutantes de la Cox2 ( $\Delta Cox2$ ) y de mutantes de la Cox3 ( $\Delta Cox3$ ). Las barras de error se calcularon a partir de la media de tres réplicas.

Como se observa en la Figura 26, el Cit  $c_6$  reacciona con las membranas de heterocistos de las estirpes silvestre y  $\Delta Cox3$ , pero no con las del mutante  $\Delta Cox2$ , lo cual indicaría que el Cit  $c_6$  reacciona con la Cox1 de células vegetativas y con la Cox2 de heterocistos, pero no con la Cox3. Los resultados obtenidos con el Cit  $c_{6-3}$  son más complejos de explicar. El Cit  $c_{6-3}$  reacciona con las membranas de heterocistos silvestres pero no con las de los mutantes  $\Delta Cox2$  y  $\Delta Cox3$ . Como se observa en la Figura 26, para que se produzca consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_{6-3}$  deben estar presentes Cox2 y Cox3 simultáneamente. Estos análisis indican que la posible función del Cit  $c_{6-3}$

en la cadena respiratoria del heterocisto debe ser diferente a la del Cit  $c_6$ , el cual actúa como "citocromo c respiratorio".

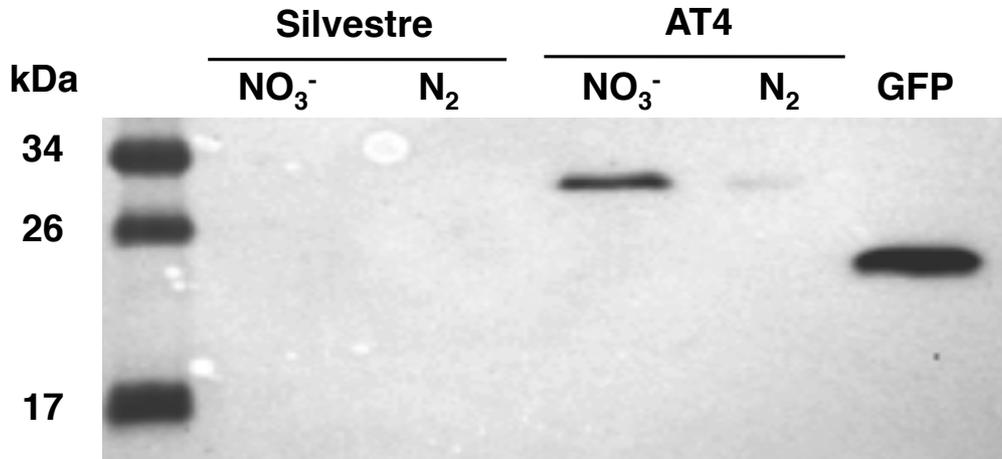
Como conclusión, el Cit  $c_{6-3}$  podría captar electrones del Cit  $f$  y cederlo a las oxidadas terminales presentes en los heterocistos; pero, en este último caso requeriría la intervención simultánea de Cox2 y Cox3.

#### 4.1.6.4. Localización subcelular del citocromo $c_{6-3}$

Los datos funcionales indican que el Cit  $c_{6-3}$ , en condiciones diazotróficas en las que se desarrollan los heterocistos, actuaría en este tipo celular, transfiriendo electrones desde el complejo Cit  $b_6-f$  hasta las oxidadas terminales de heterocistos. Sin embargo, no se puede asegurar esto hasta comprobar que la proteína se expresa con un buen nivel de expresión y diferencialmente en los heterocistos.

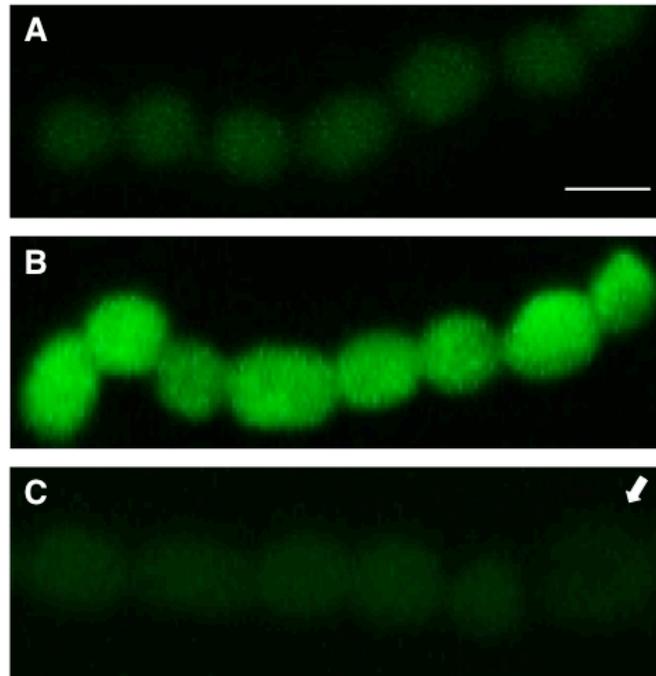
Se analizó en primer lugar la localización celular del Cit  $c_{6-3}$  mediante microscopía confocal, con una fusión traduccional con la proteína reportera *sf-GFP* (*super folded Green Fluorescence Protein*), una variante de la *GFP* más estable. La construcción fue denominada como AT4, que expresa la *sf-GFP* en el extremo C-terminal del Cit  $c_{6-3}$ . Con esta construcción sólo se detectaron niveles marginales de proteína en todas las condiciones ensayadas. Para estar seguros de que este bajo nivel de expresión no era causado por la construcción de la estirpe, se realizó un ensayo de *Western Blot* para detectar la proteína, ya que la inmunodetección es más sensible que la visualización por microscopía. Se utilizaron anticuerpos anti-*GFP*, porque los anticuerpos anti-Cit  $c_{6-3}$  también reconocían a las variantes Cit  $c_6$  y Cit  $c_{6-2}$ , debido a que la homología es muy alta entre estos Cit. La detección de la proteína se llevó a cabo bajo dos condiciones, medio completo BG11 y medio BG11<sub>0</sub>, sin nitrógeno combinado. Como se puede ver en la Figura 27, la proteína se expresa en ambas

condiciones, pero se observa una reducción drástica en la condición BG11<sub>0</sub> en la que se desarrollan los heterocistos.



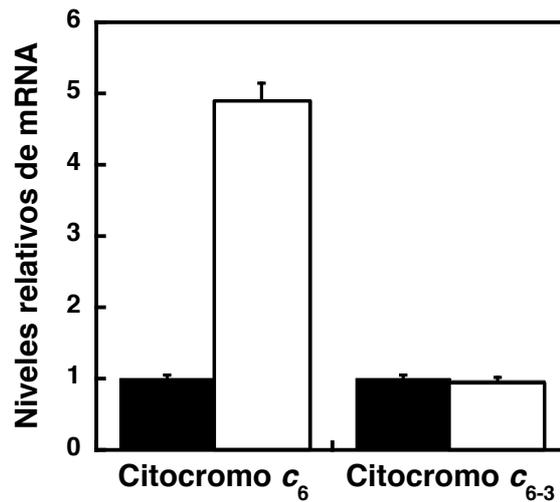
**Figura 27. Inmunodetección del citocromo  $c_{6-3}$  mediante análisis de *Western Blot*.** La inmunodetección se realizó a partir de cultivos silvestres (Silvestre) y de la estirpe AT4, que expresa una fusión del Cit  $c_{6-3}$  con la *sf-GFP*. Las condiciones de cultivo son: BG11 con nitrógeno combinado ( $\text{NO}_3^-$ ) y condiciones diazotróficas ( $\text{N}_2$ ), usando un anticuerpo anti-*GFP*.

Para contrastar esta información se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en la estirpe AT9, que contenía una secuencia de 6 histidinas en el extremo C-terminal del Cit  $c_{6-3}$ . A pesar de que la inmunofluorescencia es menos resolutive que la microscopía confocal, otorga una amplificación de señal muy potente. En la Figura 28 se pueden ver los resultados del ensayo, en los que se repite lo observado en el análisis por Western Blot. La proteína se expresa en BG11, con nitrógeno combinado, pero al entrar en diazotrofia, la cantidad de proteína disminuye de forma sensible, llegando al nivel basal de autofluorescencia del fondo.



**Figura 28. Inmunodetección mediante análisis de localización por inmunofluorescencia del citocromo  $c_{6-3}$ .** Inmunodetección realizada en las estirpes silvestre (A) y AT9 (B y C), que expresa el Cit  $c_{6-3}$  con una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal. Las condiciones de cultivo fueron BG11 (A y B) o BG11<sub>0</sub> (C) sin nitrógeno combinado. Las células se incubaron durante 24 horas con la fuente de nitrógeno indicada. Posteriormente se realizó el ensayo de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-6 histidinas y se visualizó el resultado mediante microscopía de fluorescencia. La barra de tamaño indica 6  $\mu\text{m}$ , con una magnificación similar para las tres micrografías. La flecha indica un heterocisto.

Simultáneamente a esto se estudió el nivel de expresión del gen *petJ-3* por si hubiera algún tipo de regulación transcripcional similar al del Cit  $c_6$  y la Pc. El Cit  $c_6$  y la plastocianina poseen una fuerte regulación por cobre [Bovy *et al.*, 1992], por lo que quizás los niveles de expresión que encontrábamos en los análisis previos se debían a algún tipo de regulación por este metal. Por ello, se realizaron análisis de la expresión del gen *petJ-3* (Cit  $c_{6-3}$ ), así como del gen *petJ* (Cit  $c_6$ ) como control, mediante qPCR a partir de extracciones de RNA total (Figura 29).

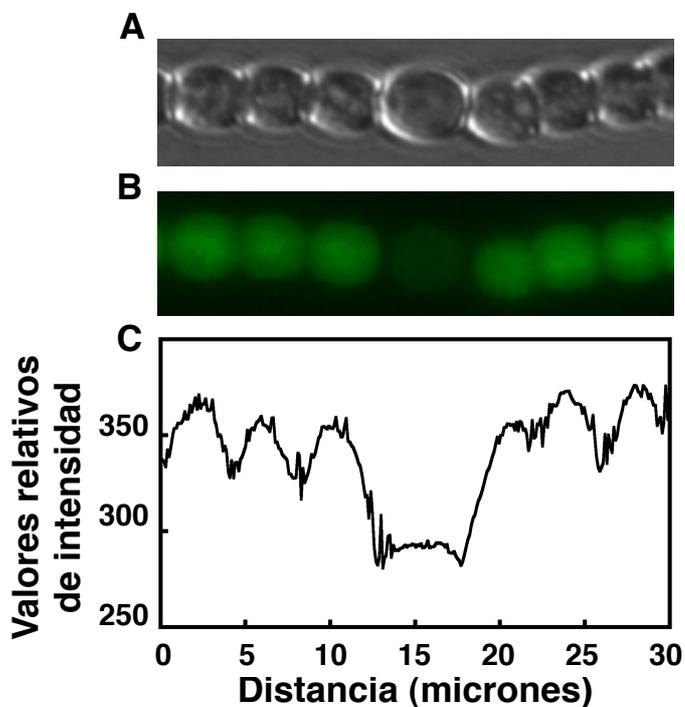


**Figura 29. Expresión relativa de los genes *petJ* y *petJ-3* por qPCR.** Niveles relativos de RNAm de los genes *petJ* y *petJ-3* de células cultivadas en medio BG11 por qPCR. En negro, células cultivadas con cobre en el medio; en blanco, células cultivadas bajo condiciones de ausencia de cobre.

Los cultivos contenían el medio BG11 completo o este medio modificado para no presentar cobre. En este último caso, se suplementó el cultivo con BCSA, un quelante de cobre, para evitar que hubiesen trazas en el medio. Como se observa en la Figura 29, el gen *petJ* está fuertemente regulado por cobre, mientras que el gen *petJ-3*, no se encuentra regulado por cobre.

Para completar estos estudios de qPCR, se intentaron hacer extracciones de RNA de heterocistos, para ver los niveles de expresión del gen *petJ-3*, pero las muestras obtenidas no tenían la integridad suficiente como para ser fiables, como ya comprobaron otros autores con este tipo de preparaciones [Park *et al.*, 2013]. Como alternativa, se decidió estudiar la expresión a través de su promotor, mediante fusión de la *GFP* a la región promotora del gen. Por ello, se realizó una construcción, denominada AT1, que contenía el gen que codifica la *GFP* unido transcripcionalmente a 700 pares de bases aguas arriba del inicio del gen *petJ-3*, incluyendo los nucleótidos que codifican los cuatro primeros aminoácidos de la secuencia del Cit  $c_{6-3}$ . Esta construcción serviría para ver los niveles de expresión en los diferentes tipos celulares, pero no para la

localización subcelular, ya que no se incluía el péptido de tránsito en la construcción. De nuevo se obtuvieron bajos niveles de fluorescencia, como ya observamos en la fusión traduccional de la proteína completa (Figura 30). Sin embargo, podemos observar que en condiciones diazotróficas la expresión en el heterocisto es de hasta un 30 % menor que en las células vegetativas. En paralelo a esto se estudió si este tipo de regulación podría ser transitoria, debido a que los heterocistos tienen un tiempo de maduración de 12 horas, pero no se observaron cambios. Por lo tanto, la expresión ni es transitoria ni se induce en condiciones diazotróficas, más bien se reprime en los heterocistos.



**Figura 30. Estudio mediante microscopía de la región promotora del citocromo  $c_{6-3}$  mediante visualización con GFP.** Filamentos de la estirpe AT1, que contiene una fusión transcripcional con la región promotora del gen *petJ-3*, incubada durante 24 horas en ausencia de nitrógeno combinado y se visualizó el campo claro (A) o la fluorescencia mediante microscopía confocal (B). (C) Cuantificación de la fluorescencia de la GFP de cada célula del filamento. Se sustrajo la fluorescencia de fondo tomando un cultivo silvestre como referencia. La célula central es un heterocisto. Los valores en la escala de grises representa la cantidad absoluta de fluorescencia de las células.

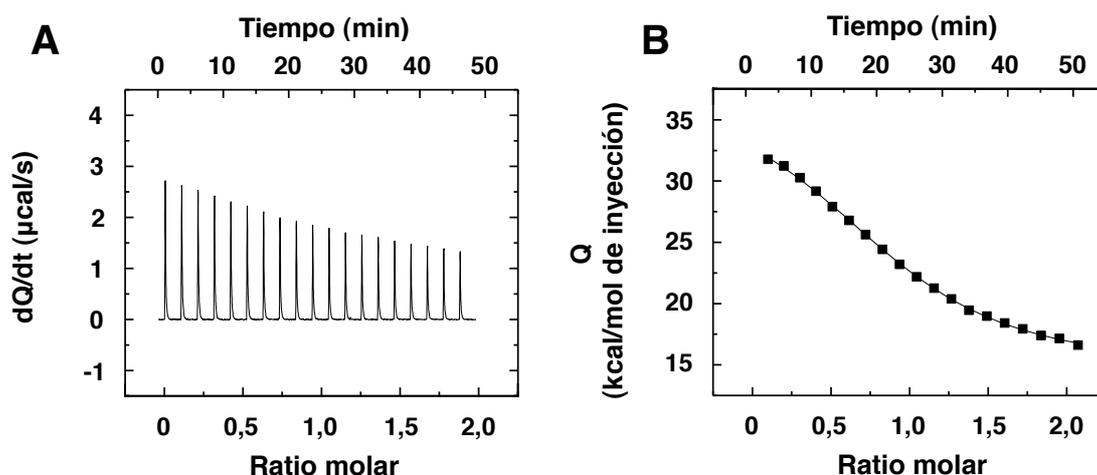
## 4.2. Citocromo $c_{6-2}$

El Cit  $c_{6-2}$  es considerado un Cit  $c_6$ -like de tipo  $c_{6C}$ , que ya había sido anteriormente caracterizado en nuestro grupo [Reyes-Sosa *et al.*, 2011]. Se sabe que es capaz de donar electrones al PS I, aunque con menor eficiencia que el Cit  $c_6$  y la Pc. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas sobre su posible función e interacción con el complejo Cit  $b_6-f$  o con las oxidasas terminales respiratorias. Por eso, en esta tesis doctoral, se procedió a estudiar su localización celular, su posible interacción con el Cit  $f$  y su reacción con las oxidasas terminales de la cadena respiratoria.

### 4.2.1. Interacción entre el citocromo $c_{6-2}$ y el citocromo $f$

Al igual que con el Cit  $c_{6-3}$ , resulta interesante conocer si existe una interacción entre este Cit y el posible donador de electrones, el complejo Cit  $b_6-f$ . El potencial rédox del Cit  $c_{6-2}$  resulta ser demasiado bajo para que exista una transferencia de electrones termodinámicamente favorable desde el Cit  $f$  al Cit  $c_{6-2}$  [Reyes-Sosa *et al.*, 2011], e incluso a un pH de 4, cercano al fisiológico (como vimos en los experimentos con el Cit  $c_{6-3}$ ), sigue siendo demasiado bajo como para ser posible la transferencia. Sin embargo, estos valores de potencial no descartan una eventual transferencia de electrones en sentido contrario; es decir, desde el Cit  $c_{6-2}$  al Cit  $f$ . Así pues, se estudió la posible interacción entre ambas proteínas mediante ITC y *Docking* molecular.

En la Figura 31 y la Tabla 13 se presentan los datos de ITC para la interacción entre el Cit  $c_{6-2}$  y el Cit  $f$ . Como se puede observar, el Cit  $c_{6-2}$  sí sería capaz de interaccionar con el Cit  $f$ , con una estequiometría de unión de 1:1 similar a la del Cit  $c_6$ . Sin embargo, la existencia de interacción no implica necesariamente una interacción en la orientación correcta para que ocurra la transferencia de electrones.

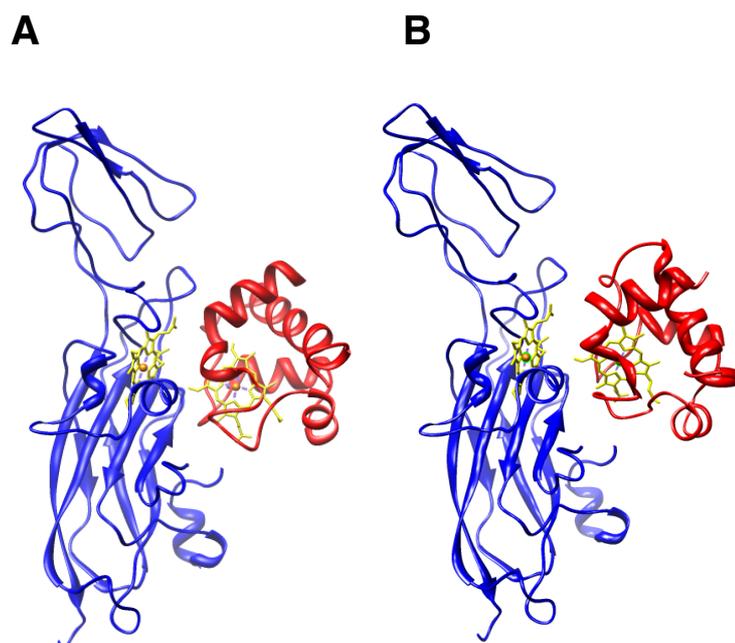


**Figura 31. Calorimetría de titulación isotérmica del complejo citocromo  $c_{6-2}$ /citocromo  $f$ .** (A) Termograma de la titulación en el que se observa una correlación entre la cantidad de Cit  $c_{6-3}$  añadido (ratio molar) y un desprendimiento de calor ( $dQ/dt$ ); (B) Ajuste de la isoterma de unión a un modelo de sitio único.

Para poder identificar si la unión de estas proteínas ocurre con una orientación favorable para la transferencia electrónica se hizo un *Docking* molecular (Figura 32), similar al que se realizó con el Cit  $c_{6-3}$  (Figura 23).

**Tabla 13. Propiedades termodinámicas de la calorimetría de los complejos citocromo  $c_6$ /citocromo  $f$  y citocromo  $c_{6-2}$ /citocromo  $f$ .**  $K_A$ : constante de asociación;  $\Delta H$ : entalpía de unión;  $\Delta G$ : energía libre;  $-T\Delta S$ : entropía de unión;  $n$ : estequiometría de unión;  $K_D$ : constante de disociación.

Proteína	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	$n$	$K_D$ ( $\mu M$ )
Cit $c_6$	$7,8 \cdot 10^4$	-14,64	-27,91	-13,26	1,10	13,0
Cit $c_{6-2}$	$8,9 \cdot 10^4$	97,07	-28,23	-125,23	0,96	11,0



**Figura 32. Docking molecular de la interacción entre citocromo  $c_6$ /citocromo  $f$  y citocromo  $c_{6-2}$ /citocromo  $f$ .** Se presentan los modelados del complejo Cit  $c_6$ /Cit  $f$  [A] y Cit  $c_{6-2}$ /Cit  $f$  [B], escogiendo los modelos equilibrados de mínima energía para cada caso.

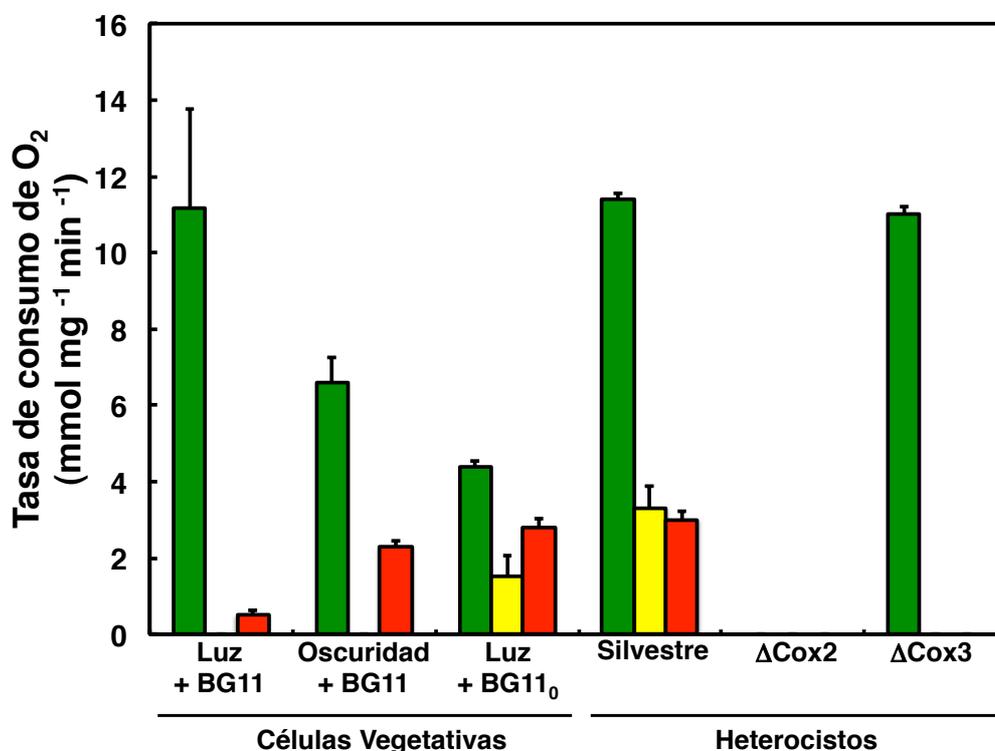
Como se observa en la Figura 32, la orientación del complejo sería favorable para que ocurriese una transferencia de electrones desde el Cit  $c_{6-2}$  al Cit  $f$ .

#### 4.2.2. Reacción entre el citocromo $c_{6-2}$ y las oxidasas terminales Cox1 y Cox2

Como ya vimos en el apartado del Cit  $c_{6-3}$ , en *Nostoc* aparecen diferentes oxidasas cuya expresión depende del tipo celular. Por ello, se analizó la reacción entre el Cit  $c_{6-2}$  y las distintas oxidasas terminales, en las mismas condiciones que las ensayadas con el Cit  $c_{6-3}$  (Figura 33).

El Cit  $c_{6-2}$  no reaccionó específicamente con ninguna oxidasa en las condiciones ensayadas, presentando niveles de reacción similares a los de proteínas inespecíficas, como el Cit  $c$  de caballo. Este hecho descarta un posible papel respiratorio del Cit  $c_{6-2}$ , aunque como ya se ha mencionado en el

trabajo de Reyes-Sosa y colaboradores [2011], podría jugar un papel en la cadena fotosintética, ya que sería capaz de interactuar con el PS I.



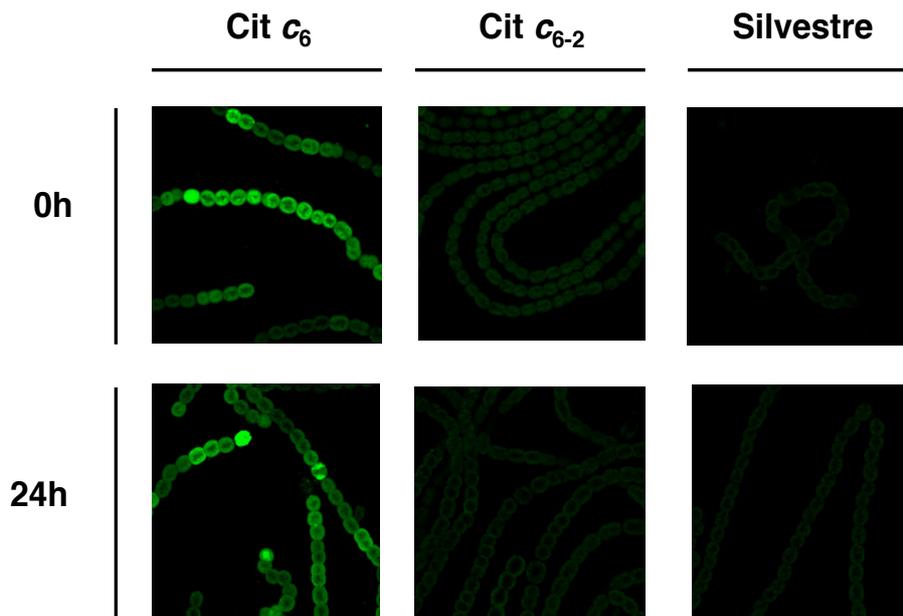
**Figura 33. Reacción del citocromo  $c_{6-2}$  con las oxidasas terminales de distintas preparaciones de membranas de *Nostoc* sp. PCC 7119 silvestre y de sus mutantes  $\Delta$ Cox2 y  $\Delta$ Cox3.** Tasas de consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_6$  (Verde), Cit  $c_{6-2}$  (Amarillo) o de Cit  $c$  de caballo (Rojo), con membranas de la estirpe silvestre extraídas en las siguientes condiciones: luz con medio BG11 completo (Luz + BG11); oscuridad con medio BG11 completo (Oscuridad + BG11); luz con medio BG11<sub>0</sub> sin nitrógeno combinado (Luz + BG11<sub>0</sub>); de esta última condición se realizó un aislamiento de heterocistos y posteriormente se hizo una extracción de membranas de estas células (Silvestre). Así mismo, se extrajeron membranas de heterocistos de los mutantes de delección de las oxidasas terminales Cox2 ( $\Delta$ Cox2) y Cox3 ( $\Delta$ Cox3). Las barras de error se calcularon a partir de la media de tres réplicas.

#### 4.2.3. Localización subcelular del citocromo $c_{6-2}$

Para conocer más sobre su posible función, se realizó un análisis de localización subcelular del Cit  $c_{6-2}$ , en las mismas condiciones que con el Cit

$c_{6-3}$ . Para ello, se diseñó una construcción que expresaba el Cit  $c_{6-2}$  fusionado traduccionalmente a la proteína reportera *sf-GFP*.

Como se observa en las imágenes de microscopía confocal de la Figura 34, no se obtuvieron resultados significativos de fluorescencia por *GFP*. Este tipo de patrón de expresión, unido a la improbable transferencia de electrones desde el Cit *f*, indica que no se trata de un transportador de electrones masivo similar al Cit  $c_6$ . Sin embargo, podría jugar algún tipo de papel regulatorio o en transferencia electrónica, cediendo electrones al complejo Cit  $b_6-f$  en lugar de captarlos. Esto abriría las puertas a la existencia de un *pool* de proteínas capaces de reducir al Cit  $b_6-f$  que interviniesen en un flujo cíclico.



**Figura 34. Estudio de fluorescencia mediante microscopía confocal del citocromo  $c_{6-2}$ , mediante visualización con *GFP*.** Filamentos de la estirpe AT2 (Cit  $c_6$ ) y AT3 (Cit  $c_{6-2}$ ), que contienen una fusión traduccional de la *sf-GFP* con la región codificante de los genes *petJ* y *petJ-2*, respectivamente, así como filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7119 (Silvestre). Los cultivos se presentan antes (0 h) y después de una incubación de 24 horas en ausencia de nitrógeno combinado (24 h).

### 4.3. Citocromo $c_M$

Hasta ahora sólo se había caracterizado parcialmente el Cit  $c_M$  de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 y su función aún se desconoce. Se ha propuesto que es capaz de donar electrones a las oxidasas terminales con una eficiencia mayor que el Cit  $c_6$  y la Pc [Bernroitner *et al.*, 2009]. Por contra, es incapaz de captar electrones del Cit  $b_6-f$ , así como de donárselos al PS I [Molina-Heredia *et al.*, 2002]. Se ha demostrado que en células cultivadas en condiciones normales el nivel de RNAm de Cit  $c_M$  es muy bajo y que mutantes que carecen de Cit  $c_M$  crecen normalmente bajo condiciones fotoautótrofas, exhibiendo tasas de fotosíntesis y respiración que son comparables a las de células de tipo silvestre [Malakhov *et al.*, 1994; Manna y Vermaas, 1997; Pils *et al.*, 1997]. En cambio, en condiciones de estrés (baja temperatura y alta intensidad de la luz), cuando se reprime la síntesis de las dos metaloproteínas solubles Cit  $c_6$  y Pc, la expresión del Cit  $c_M$  aumenta drásticamente [Malakhov *et al.*, 1994]. Manna y Vermaas [1997] han sugerido que el Cit  $c_M$  podría operar en el transporte de electrones respiratorio, mediando la transferencia de electrones desde la Pc y/o el Cit  $c_6$  a una Cox de tipo Caa3. Su sugerencia se basa en el análisis del transporte de electrones en los mutantes de delección del Cit  $c_M$  en *Synechocystis* sp. 6803, organismo en el cual fue imposible obtener un doble mutante de delección Cit  $c_M$ /Cit  $c_6$  y en el que en un mutante de delección del Cit  $c_M$  no se podía eliminar la actividad del PS I, indicando que el Cit  $c_M$  podría ser necesario para la transferencia electrónica en respiración.

Por eso, en esta tesis doctoral, se procedió a estudiar su localización celular y su posible reacción con las oxidasas terminales de la cadena respiratoria. Todo el trabajo se realizó en *Nostoc* sp. PCC 7119.

### 4.3.1. Clonación del gen *cytM*, expresión y purificación del citocromo $c_M$

Partiendo de la secuencia conocida del gen *all1365* de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, se diseñaron dos oligonucleótidos que, por PCR, permitiesen amplificar la ORF completa del gen *cytM* de *Nostoc* sp. PCC 7119. La secuencia de dichos oligonucleótidos fue:

**AnaCMD** AACTTTTACAGGACACCTTATGGA

**AnaCMR** TAAATATGAATTCCTGATGTA AAAACC

Tras la PCR, el fragmento de DNA amplificado se ligó en el plásmido pCRII, dando lugar al vector pCRII::CitM, y se secuenció (Figura 35). Al igual que en el caso del gen *petJ-3*, se secuenciaron tres insertos de DNA procedentes de tres PCR independientes para estar seguros de que la reacción de PCR no introducía ningún error. La secuencia se depositó en la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos EMBL con el número de acceso: **LT717489**.

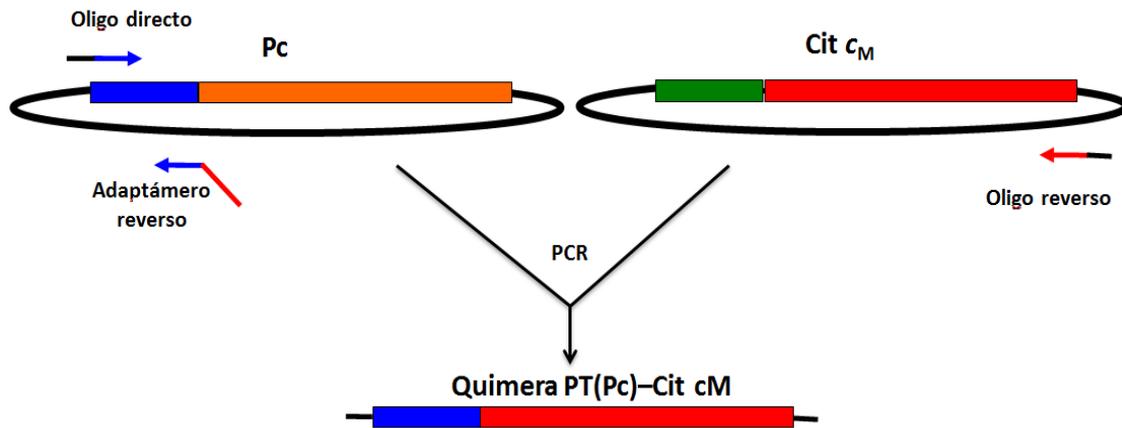
```

TTG GAT AAC CAG ATT ACC AAA CCT GAA ATT CTG ATT CAG CGT ATC < 45
L D N Q I T K P E I L I Q R I
GCT TTA GTG GCG CTA GTG ATA CTG CTA GCA ATC CCT TTG GGC TTT < 90
A L V A L V I L L A I P L G F
TTT GGT GTT CAG TTG GTG AAA GCC TCT GAC CCT TAT GTT AAG AGT < 135
F G V Q L V K A S D P Y V K S
GTT CTT GCC ATG AAA GGA GAC CCA ATA CAG GGA CAC GCT ATT TTT < 180
V L A M K G D P I Q G H A I F
CAA ATA AAT TGT GCT GGT TGT CAT GGT TTA GAA GCA GAT GGC CGA < 225
Q I N C A G C H G L E A D G R
GTA GGC CCC AGC TTA CAA GCA GTT TCT AAG CGT AAG TCC AAG TAT < 270
V G P S L Q A V S K R K S K Y
GGG CTA ATT CAC CAA GTT ATT AGC GGT GAT ACA CCA CCA ATG CCA < 315
G L I H Q V I S G D T P P M P
AAA TTT CAG CCC AAC ACC CAA GAA ATG GCA GAT CTT TTA AGC TTT < 360
K F Q P N T Q E M A D L L S F
TTG GAG ACT TTA TAG < 375
L E T L *
```

**Figura 35. Secuencia de la ORF del gen *cytM* de *Nostoc* sp. PCC 7119 y de la proteína citocromo  $c_M$ .** En verde se señala el péptido de tránsito; en azul, la secuencia codificante de la proteína.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen *cytM* se analizó con el programas *SignalP* 1.1, del servidor *Expasy* [Apartado 3.9 de Materiales y Métodos], para localizar, en cada caso, el posible péptido de tránsito, la diana de proteólisis y la posible localización celular en *E. coli* del Cit  $c_M$ . Como resultado, el preapo-Cit  $c_M$  presentó una posible secuencia transmembrana entre los residuos 1 y 38 (Figura 35) y una posible diana de proteólisis VLA-MK con un posible sitio de corte entre los residuos 48 y 49, algo lejos del fin de la región transmembrana. La localización estimada para la proteína madura resultó ser en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas, con una probabilidad del 98,3 %.

A la hora de expresar heterológamente la proteína en *E. coli* se encontraron numerosos problemas. Para resolverlos se procedió a sustituir el péptido de tránsito de la proteína por un péptido de tránsito más favorable para la producción de proteínas: el péptido de tránsito de la Pc de *Nostoc* sp. PCC 7119. La sustitución del péptido de tránsito del Cit  $c_M$  por el de la Pc de *Nostoc* sp. PCC 7119 se llevó a cabo mediante fusión por PCR. Para ello se diseñó un adaptámero con la primera mitad de la secuencia idéntica al extremo 3' del fragmento de DNA que codifica el péptido de tránsito de la Pc y con la otra mitad correspondiente a la región 5' del gen *cytM*, por donde empieza la proteína madura. De esta forma, y en un sólo paso de PCR, se pudo obtener un gen quimérico que codificaba el Cit  $c_M$  fusionado al péptido de tránsito de la Pc (Figura 36). La PCR se realizó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero como DNA molde, se utilizó una mezcla de los vectores pCRII::CitM (este trabajo) y pEAPC-WT [Molina-Heredia *et al.*, 1998] y como cebadores se utilizaron tres oligonucleótidos: el oligonucleótido directo PC-D, complementario al extremo 5' del gen *petE* (que codifica para la Pc); como cebador reverso se utilizó el oligonucleótido AnaCMR; y el adaptámero CM (reverso) para la fusión del péptido de tránsito. El producto de la PCR se ligó en el vector pCRII (Stratagene), en fase con el promotor del fago T7, dando lugar al vector pEACCM-T7, y en fase con el promotor *lac*, dando lugar al vector pEACCM-lac.



**Figura 36. Esquema de la obtención del gen quimérico que codifica el citocromo  $c_M$  fusionado al péptido de tránsito de la plastocianina.** El gen quimérico se obtuvo en un sólo paso de PCR en el que se utilizaron dos moldes y tres oligonucleótidos.

Se ensayó la expresión de los vectores pEACCM-T7 y pEACCM-lac, con y sin la co-expresión del plásmido pEC86, en diferentes estirpes de *E. coli* (el vector pEACCM-T7 sólo se probó en estirpes que expresaban la polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac*). Como se puede observar en la Tabla 14, sólo se obtuvo expresión a partir del plásmido pEACCM-lac en las estirpes K12 y BL21 (DE3) y además con la co-expresión del vector pEC86.

**Tabla 14. Pruebas de expresión del citocromo  $c_M$  en *E. coli*.** Rendimiento volumétrico obtenido tras la expresión del Cit  $c_M$  en diferentes estirpes de *E. coli* con o sin co-expresión con el plásmido pEC86.

Estirpes de <i>E. coli</i>	Sin pEC86	Con pEC86
	(mg/l)	(mg/l)
JM109	0,0	0,0
GM119 ( $\lambda$ 1-pir)	0,0	0,0
K12	0,0	trazas
DH10B	0,0	0,0
DH5 $\alpha$	0,0	0,0
BL21 (DE3)	0,1	2,0
MC1061	0,0	0,0

Estos niveles de producción de Cit  $c_M$  se obtuvieron en volúmenes de 100 ml de cultivo. Al escalar, a partir de volúmenes de más de 500 ml de cultivo, se perdía casi completamente la producción.

Dados los problemas con el escalado de la producción del Cit  $c_M$ , se decidió optimizar el uso de codones del gen. Para eso se diseñó un gen sintético, teniendo en cuenta el mejor uso de codones de *E. coli* (Figura 37).

```

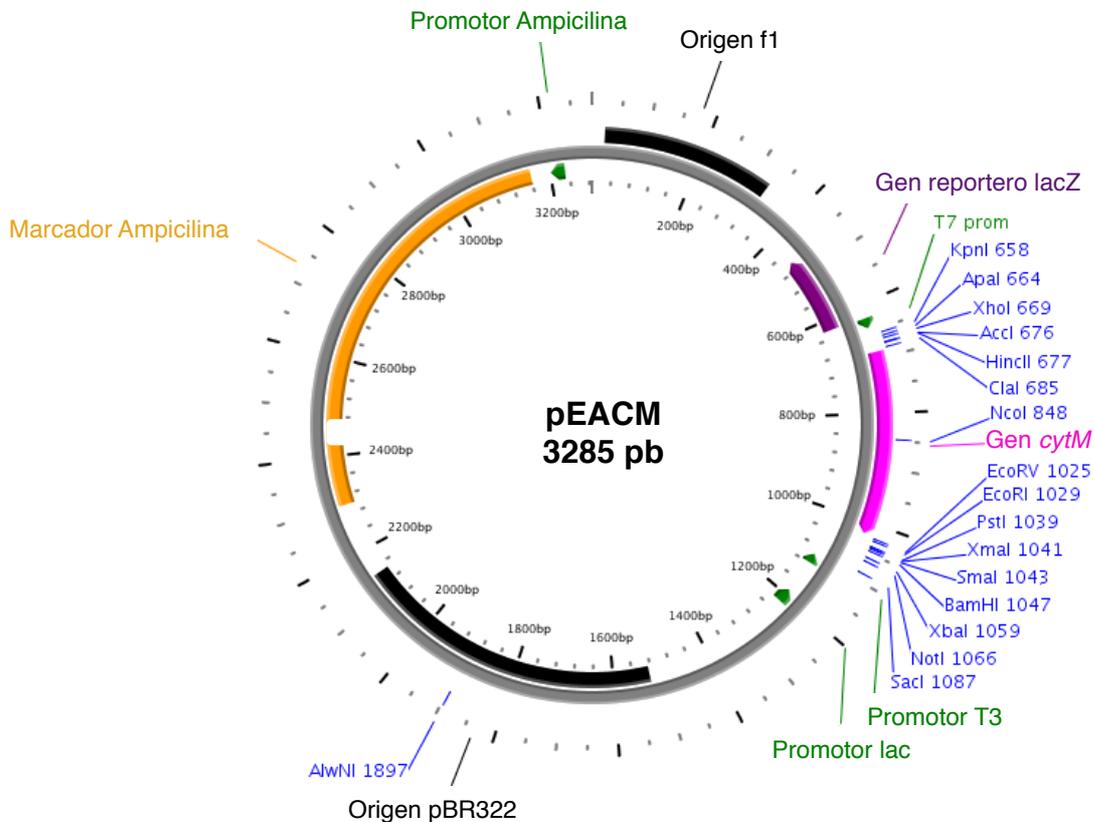
ATG AAA CTG ATC GCG GCG AGC CTG CGT CGT CTG TCT CTG GCG GTT < 45
M   K   L   I   A   A   S   L   R   R   L   S   L   A   V
CTG ACC GTT CTG CTG GTT GTT TCT TCT TTC GCG GTT TTC ACC CCG < 90
L   T   V   L   L   V   V   S   S   F   A   V   F   T   P
TCT GCG TCC GCG ATG AAA GGT GAC CCG ATC CAG GGT CAC GCG ATC < 135
S   A   S   A   M   K   G   D   P   I   Q   G   H   A   I
TTT CAG ATC AAC TGC GCG GGT TGC CAT GGT CTG GAA GCG GAC GGT < 180
F   Q   I   N   C   A   G   C   H   G   L   E   A   D   G
CGT GTT GGT CCG TCT CTG CAA GCG GTT TCT AAA CGT AAA TCT AAA < 225
R   V   G   P   S   L   Q   A   V   S   K   R   K   S   K
TAC GGT CTG ATC CAC CAG GTT ATC TCT GGT GAT ACT CCG CCG ATG < 270
Y   G   L   I   H   Q   V   I   S   G   D   T   P   P   M
CCG AAA TTC CAG CCG AAC ACC CAA GAA ATG GCG GAC CTG CTG TCT < 315
P   K   F   Q   P   N   T   Q   E   M   A   D   L   L   S
TTC CTG GAA ACC CTG TAG < 333
F   L   E   T   L   *
    
```

**Figura 37. Secuencia de la ORF del gen *cytM* de *Nostoc* sp. PCC 7119 optimizado para el uso de codones de *E. coli*, así como la secuencia de la proteína citocromo  $c_M$ .** En verde se señala el péptido de tránsito de la plastocianina de *Nostoc* sp. PCC 7119; en azul, la secuencia codificante de la proteína.

Dicho gen sintético se clonó en el vector pBluescript II KS (+), utilizando la diana *Hind*III presente tanto en la secuencia sintética como en el sitio múltiple de clonación del vector, dando lugar al plásmido pEACM (Figura 38).

Las pruebas de expresión de este nuevo gen sintético que codifica el Cit  $c_M$  de *Nostoc* en *E. coli* se ensayaron en condiciones aerobias y microaerobias con distintos medios y tiempos de cultivo. El primer paso fue probar nuevamente todas las estirpes de *E. coli* que habían sido usadas antes del cambio de plásmido, obteniendo únicamente citocromo en la estirpe GM119, con y sin

co-expresión con el plásmido pEC86, y trazas en JM109 al co-transformarse con el plásmido pEC86 (Tabla 15).



**Figura 38. Plásmido pEACM para la expresión del citocromo  $c_M$ .** El plásmido original es el pBluescript II KS (+), con la inserción de la región codificante para el gen *cytM* (rosa).

Con estos resultados se consideró adecuada para la producción del citocromo la estirpe GM119, dado que presentaba un mayor rendimiento que el resto de estirpes probadas. Finalmente, se procedió al escalado y se realizó un cultivo de 24 l de LB inoculado con la estirpe GM119 ( $\lambda$  1-pir) co-transformada con el plásmido pEC86 y se obtuvieron 27 mg de Cit  $c_M$ , lo que supone una producción de 1,1 mg/l. Partiendo de esto los extractos se dializaron y posteriormente se procedió a realizar una cromatografía en una columna de intercambio aniónico. Tras este paso, las muestras se concentraron y se realizó una cromatografía de exclusión molecular. Finalmente se obtuvieron 1,7 mg de

Cit  $c_M$  con una relación de pureza  $A_{275}/A_{550}$  de 0,8, prácticamente puro a homogeneidad electroforética. Tras la producción de la proteína, pese a las dificultades encontradas, se comenzó con la caracterización físico-química del Cit  $c_M$ .

**Tabla 15. Pruebas de expresión del gen sintético del Cit  $c_M$  en *E. coli*.** Rendimiento volumétrico obtenido con la expresión del Cit  $c_M$  en diferentes estirpes de *E. coli* co-expresado con el plásmido pEC86 y sin él.

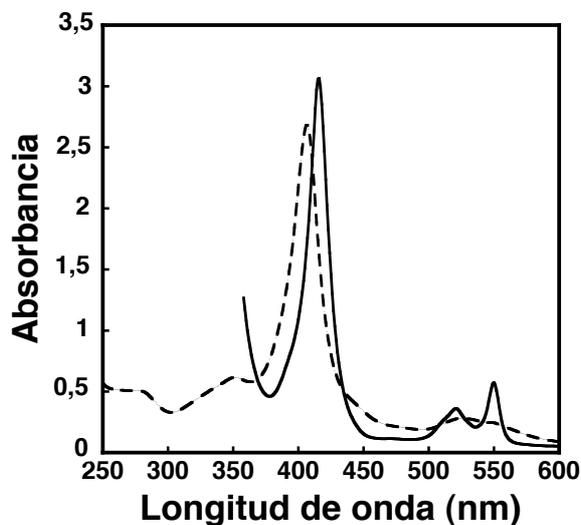
Estirpes de <i>E. coli</i>	Sin pEC86 (mg/l)	Con pEC86 (mg/l)
JM109	0,0	trazas
GM119 ( $\lambda$ 1-pir)	0,5	0,76
K12	0,0	0,0
DH10B	0,0	0,0
DH5 $\alpha$	0,0	0,0
BL21 (DE3)	0,0	0,0
MC1061	0,0	0,0

#### 4.3.2. Caracterización físico-química del citocromo $c_M$

Primero se secuenció el extremo amino terminal, para comprobar el procesado de la proteína. La secuencia del extremo amino terminal obtenida por secuenciación por degradación de Edman, fue **MKGD** con lo que se confirma que *E. coli* es capaz de procesar correctamente a la proteína recombinante.

Así mismo, se realizó un espectro de absorción UV/Vis para identificar las bandas características del Cit  $c_M$ . En la Figura 39 se muestra el espectro de absorción UV/vis de la proteína reducida y oxidada. En el espectro reducido, se distinguen las siguientes bandas características: banda  $\alpha$  (550 nm), banda  $\beta$  (521 nm) y Soret (416 nm). Tras su oxidación, las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  desaparecen y se observa otra, más amplia, a 525 nm y la banda Soret se desplaza hasta los

407 nm. Dichos valores prácticamente coinciden con los obtenidos para el Cit  $c_M$  de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tabla 16).



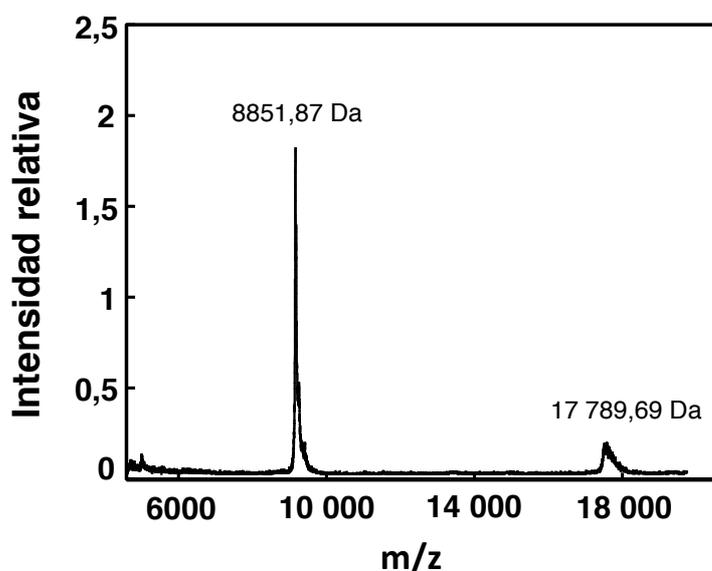
**Figura 39. Espectro de absorción UV/Vis del citocromo  $c_M$  de *Nostoc* sp. PCC 7119.** La línea discontinua representa el espectro de la forma oxidada y la línea continua, el espectro de la forma reducida. Se suprimió la región del espectro de la forma reducida entre 250-350 nm ya que el reductor empleado (ditionito sódico) absorbe en esta región.

También se determinó el coeficiente de extinción mediante el método del piridín-hemocromo. Para el Cit  $c_M$  se obtuvo un  $\epsilon_{550}$  con el valor de **28,42  $\pm$  0,37  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$** , un valor muy semejante al  $\epsilon_{550}$  del Cit  $c_M$  de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tabla 16). El  $\epsilon$  diferencial oxidado-reducido obtenido para el Cit  $c_M$  de *Nostoc* sp PCC 7119 fue de **16,24  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$** .

Posteriormente, se procedió con la determinación de la masa molecular del Cit  $c_M$ . El peso molecular del Cit  $c_M$  de *Nostoc* fue de **8851,87 Da** (Figura 40), un valor muy semejante al teórico de 8905,4 Da y a la del Cit  $c_M$  de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Tabla 16). En el espectro se aprecia un segundo pico de intensidad menor a 17 789,69 Da que podría tratarse de un dímero, o bien de un contaminante proteico.

El  $pI$  del Cit  $c_M$  no pudo determinarse con exactitud ya que aparecían dos bandas en el carril del gel del isoelectroenfoco. Los valores de  $pI$  eran muy

similares, entre sí (6,5 y 6,8, respectivamente) y al  $pI$  teórico de 6,8. Esto podría deberse a que, como la proteína es muy inestable, una de las bandas correspondiese a la de la proteína nativa y la otra a la proteína desnaturalizada. Cabe destacar que el  $pI$  del Cit  $c_M$  de *Synechocystis* sp. PCC 6803 es mucho menor, con un valor de 5,57 [Cho *et al.*, 2000].



**Figura 40. Análisis por MALDI-TOF del citocromo  $c_M$  de *Nostoc* sp. PCC 7119 expresado en *E. coli*.** El pico base corresponde al Cit  $c_M$  de *Nostoc* sp. PCC 7119 de masa molecular de 8851,81 Da. El ruido de fondo es muy pequeño revelando el alto nivel de pureza de la muestra.

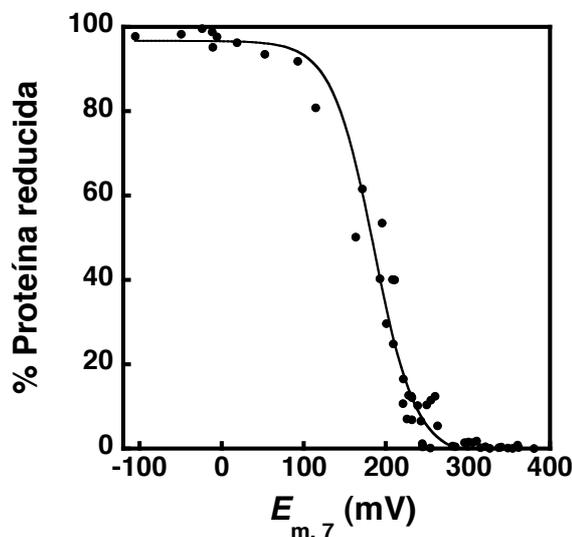
**Tabla 16. Comparación entre los parámetros físico-químicos del citocromo  $c_M$  *Nostoc* y *Synechocystis*.**

Organismo	Banda $\alpha$ (nm)	$\epsilon$ banda $\alpha$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Peso molecular (Da)	$E_{m,7}$ (mV)
<i>Nostoc</i>	550	28,4	8852	187
<i>Synechocystis</i>	551*	28,5*	8300*	150*

\* Datos obtenidos de Molina-Heredia y colaboradores [2002].

Otra característica importante a determinar fue el potencial rédox, clave en la función que podría realizar. El potencial rédox estándar del Cit  $c_M$  fue de **186,9  $\pm$  1,32 mV**. En la Figura 41 se muestra la titulación reductiva del Cit  $c_M$ . Este potencial rédox es 37 mV superior al del Cit  $c_M$  de *Synechocystis* sp. PCC 6803

(Tabla 16). Teniendo en cuenta sólo este dato, sería improbable la reducción del Cit  $b_6-f$ , como ocurre con el Cit  $c_{6-2}$ .

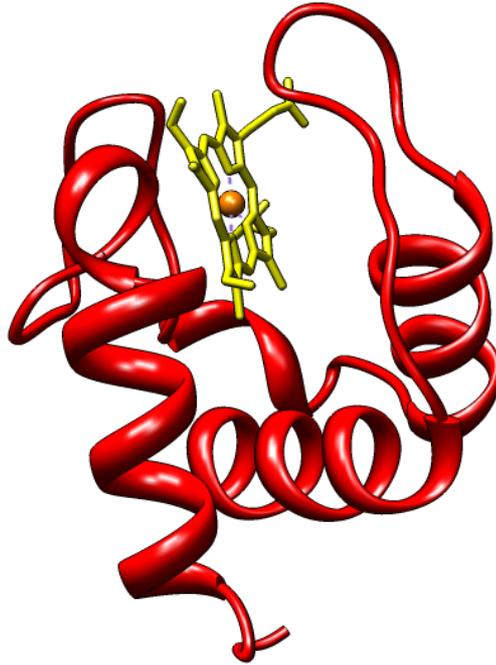


**Figura 41.** Titulación potenciométrica redox del citocromo  $c_M$  a pH 7,0. Se presenta la titulación reductiva del Cit  $c_M$  y el ajuste a la ecuación de Nernst para un electrón como una línea continua.

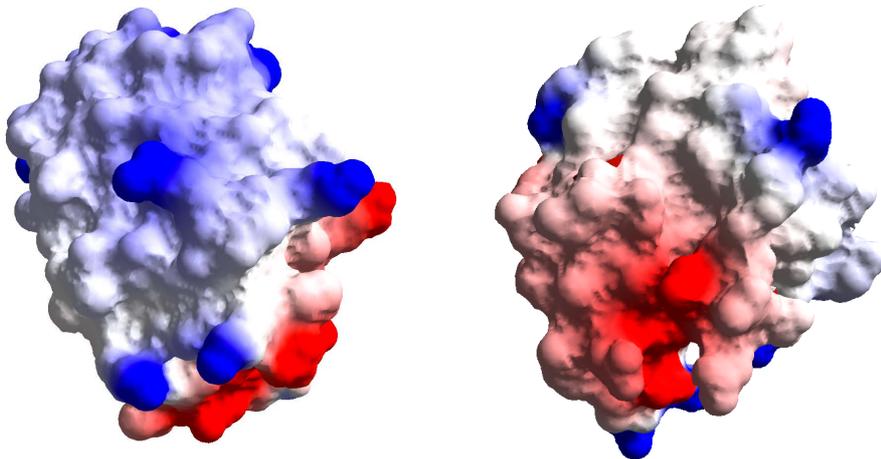
#### 4.3.3. Docking molecular del citocromo $c_M$

Al igual que ocurría con el Cit  $c_{6-3}$ , no sólo es importante la homología a nivel de secuencia, sino que también lo es la localización tridimensional de estos aminoácidos conservados. Por eso se realizó un modelo de la estructura del Cit  $c_M$  (Figura 42). A partir de este modelo, se calculó la superficie de potencial electrostático a través de una aproximación de tipo Coulomb (Figura 43).

Como se puede observar, el Cit  $c_M$  no conserva la superficie de interacción electrostática que dirige las interacciones entre proteínas a larga distancia (Figura 43), lo cual haría presagiar una baja interacción con el PS I.

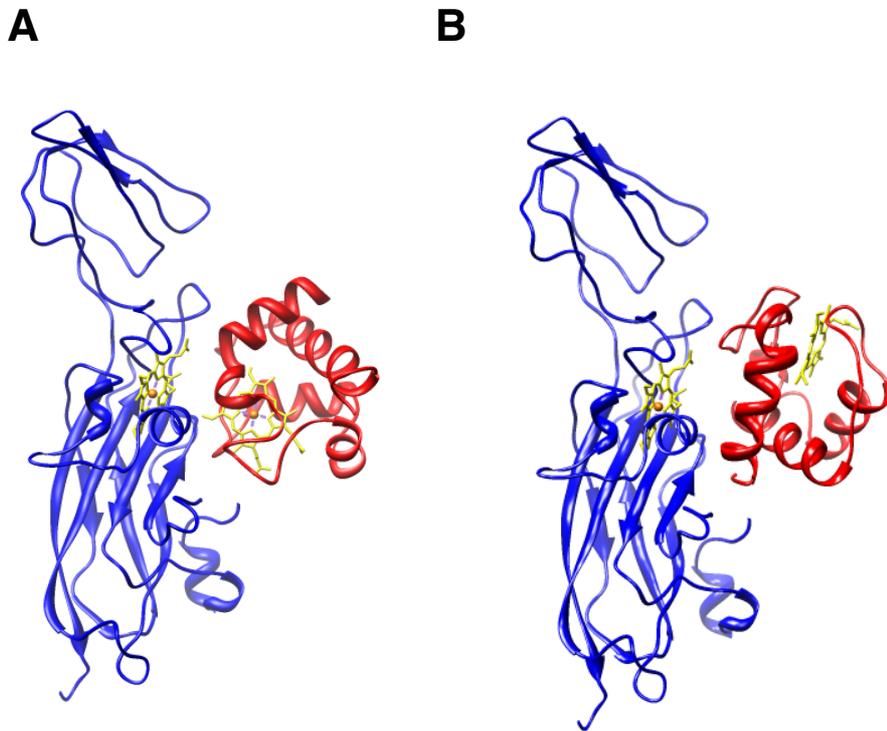


**Figura 42. Modelo tridimensional de la estructura del citocromo  $c_M$ .** Realizado mediante *threading* utilizando el servidor *Phyre*<sup>2</sup>. Las coordenadas del grupo hemo se modelaron a partir de la estructura del Cit  $c_6$  [código PDB [4GYD](#), Díaz-Moreno *et al.*, 2014]. Para la visualización del *cartoon* se utilizó el software Chimera. Están orientado con el sitio de interacción hidrófobo en la parte superior y con el electrostático de frente. En amarillo se muestra el grupo hemo y en naranja el átomo de hierro.



**Figura 43. Potencial electrostático de superficie de los Cit  $c_6$  y  $c_M$ .** Se han modelado los Cit  $c_6$  (izquierda) y  $c_M$  (derecha), orientados con el sitio de interacción hidrófobo en la parte superior y con el electrostático de frente. En rojo se muestran las zonas de la superficie con carga neta negativa y en azul las que presentan carga neta positiva.

Posteriormente, estas estructuras fueron empleadas en experimentos de *docking* molecular con el Cit *f*. En la Figura 44 se muestran las estructuras correspondientes a los modelos equilibrados de mínima energía.



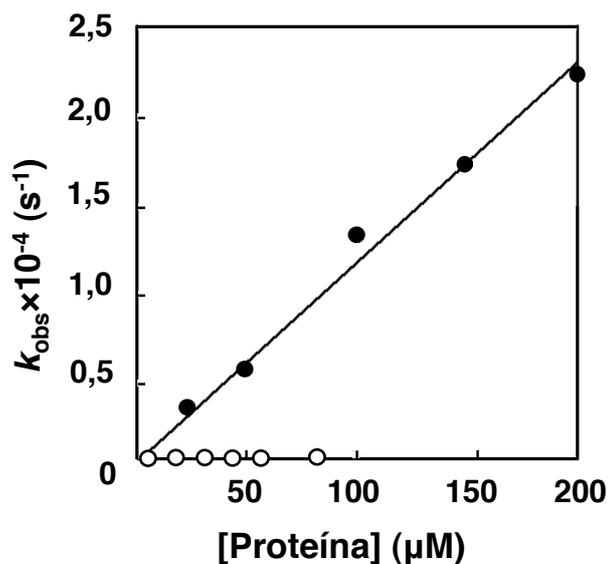
**Figura 44. *Docking* molecular de la interacción entre citocromo  $c_6$ /citocromo *f* y citocromo  $c_M$ /citocromo *f*.** Se presentan los modelados del complejo Cit  $c_6$ /Cit *f* [A] y Cit  $c_M$ /Cit *f* [B], escogiendo los modelos equilibrados de mínima energía para cada caso.

Para los complejos Cit  $c_M$ /Cit *f* predichos por *Docking* (Figura 44), observamos que el Cit  $c_M$ , se dispone en una orientación nada favorable para la transferencia de electrones, ya que una  $\alpha$ -hélice se interpone en la zona de interacción entre los grupos hemo de ambas proteínas. Ello podría confirmar que el Cit  $c_M$  de *Nostoc* sp. PCC 7119 es incapaz de recibir electrones del complejo Cit  $b_6$ -*f* de la misma forma que ocurre en *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Hiraide *et al.*, 2015].

#### 4.3.4. Análisis funcional del citocromo $c_M$

##### 4.3.4.1. Interacción entre el citocromo $c_M$ y el PS I

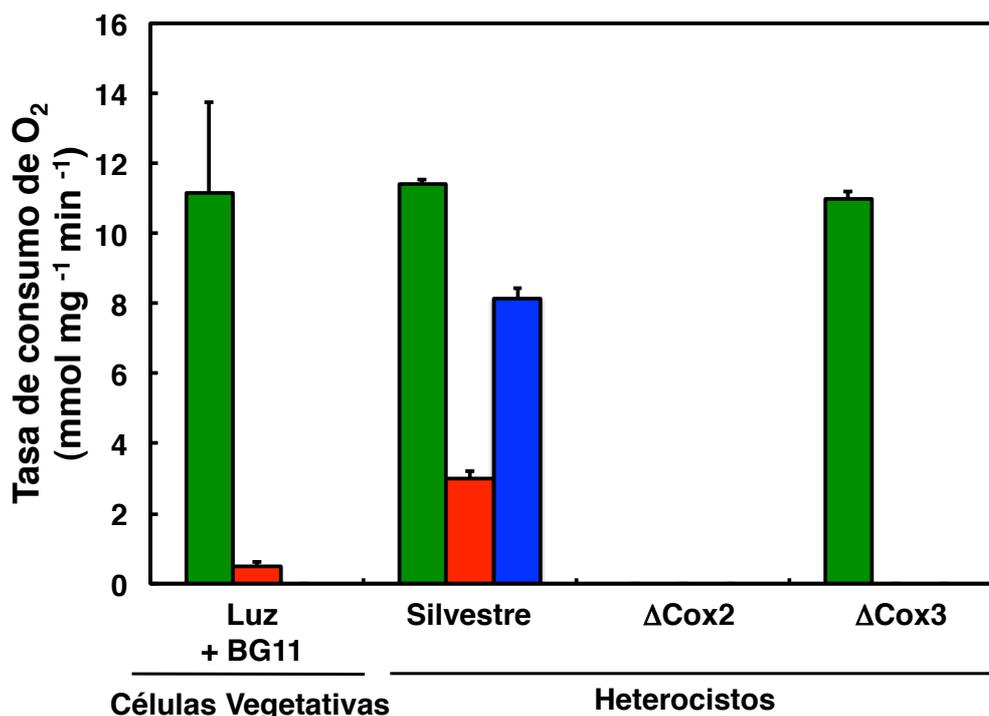
Mediante espectrometría cinética inducida por pulsos láser, se intentó determinar las constantes de reacción ( $k_{obs}$ ) del Cit  $c_M$  con el PS I, estando en este caso las cinéticas en el límite inferior de detección del equipo. Como se observa en la Figura 45, la reducción del PS I por el Cit  $c_M$  no puede ser fisiológica, siendo imposible el cálculo de las constantes de la reacción debido a su extrema lentitud. A igual que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 [Molina-Heredia *et al.*, 2002; Hiraide *et al.*, 2015], en *Nostoc* sp. PCC 7119 se descarta que el Cit  $c_M$  desempeñe un papel fotosintético.



**Figura 45. Transferencia electrónica desde los citocromos  $c_6$  y  $c_M$  al fotosistema I.** Se presentan los valores de transferencia de Cit  $c_6$  (puntos negros) y  $c_M$  (círculos blancos) respecto a la concentración de proteína, indicando una ineficiencia del Cit  $c_M$  en la interacción con el PS I.

#### 4.3.4.2. Reacción entre el citocromo $c_M$ y las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3

Se procedió a estudiar la posibilidad de la transferencia electrónica desde el Cit  $c_M$  hasta las oxidasas terminales respiratorias, un papel que ya se había propuesto para este Cit [Malakhov *et al.*, 1999; Manna y Vermaas, 1997]. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que Cit  $c_{6-3}$  y Cit  $c_{6-2}$  para estudiar si las diferentes condiciones o mutantes influían en la actividad. En la Figura 46 se puede ver que el Cit  $c_M$  sólo reaccionaría con membranas enriquecidas en oxidasas terminales de heterocistos, como vimos en el caso del Cit  $c_{6-3}$ . Además, se ve una ausencia de actividad con membranas procedentes de ambos mutantes de delección.

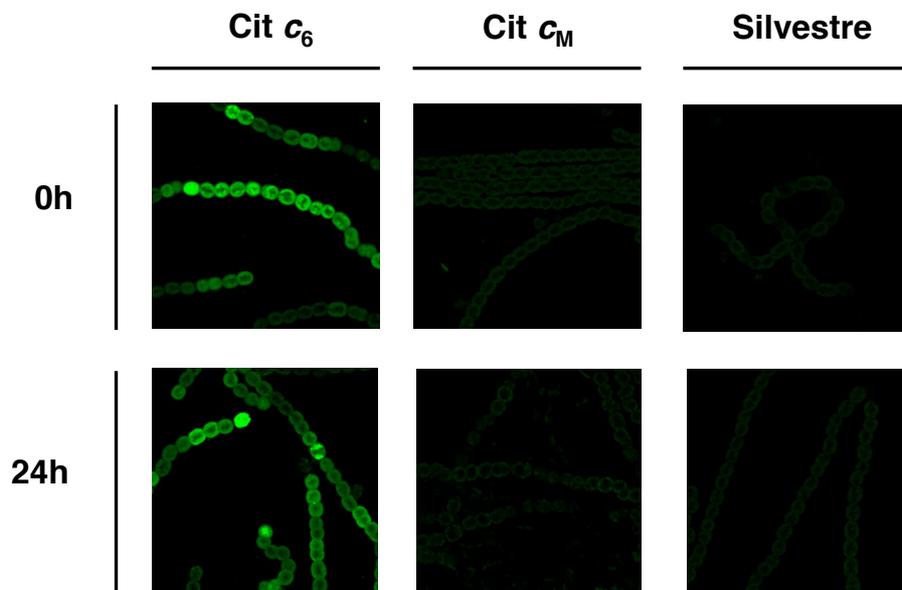


**Figura 46. Interacción del Cit  $c_M$  con oxidasas terminales de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Tasas de consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_6$  (Verde), Cit  $c_M$  (Azul) o de Cit  $c$  de caballo (Rojo) membranas extraídas en las siguientes condiciones: luz con medio BG11 completo (Luz + BG11); luz con medio BG11<sub>0</sub> sin nitrógeno combinado, de la cual se realizó un aislamiento de heterocistos y posteriormente se hizo una extracción de membranas de estas células (Silvestre); de los mutantes de las

oxidasas terminales de heterocistos Cox2 ( $\Delta$ Cox2) y Cox3 ( $\Delta$ Cox3). Las barras de error se calcularon a partir de la media de tres réplicas.

#### 4.3.5. Localización subcelular citocromo $c_M$

Tras los estudios funcionales y el posible papel respiratorio, se realizaron estudios de localización para contrastar si la localización de la proteína estaba relacionada con el heterocistos. Sin embargo, como ocurrió con el Cit  $c_{6-2}$ , la señal de localización fue muy baja (Figura 47) y no se pudo localizar la proteína.



**Figura 47. Estudio de fluorescencia mediante microscopía confocal del citocromo  $c_M$ , mediante visualización con *GFP*.** Filamentos de la estirpe AT2 (Cit  $c_6$ ) y AT5 (Cit  $c_M$ ), que contienen una fusión traduccional con la región codificante de los genes *petJ* y *cytM*, respectivamente, así como filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7119 (Silvestre). Los cultivos se presentan antes (0 h) y después de una incubación de 24 horas en ausencia de nitrógeno combinado (24 h).

Todos los datos obtenidos descartan, definitivamente, un posible papel relevante del Cit  $c_M$  en la cadena respiratoria.

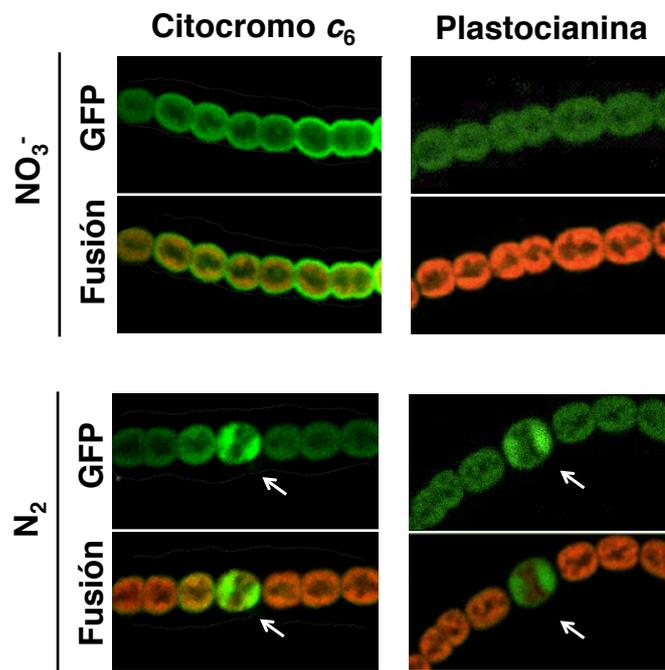
#### 4.4. Citocromo $c_6$ y plastocianina

El Cit  $c_6$  y la Pc han sido ampliamente estudiados, tanto a nivel funcional como estructural. El Cit  $c_6$ , como ya se ha comentado, sería el encargado del transporte de electrones desde el complejo Cit  $b_6-f$  hasta el PS I o hasta las oxidasas terminales en el lumen tilacoidal de cianobacterias y en cloroplastos de numerosas algas eucariotas [Hervás *et al.*, 2003]. Sin embargo, no se conoce aún en detalle la localización subcelular de la Pc, y mucho menos la localización de ambas proteínas en cianobacterias que presentan diferenciación celular en heterocistos. Se ha localizado el Cit  $c_6$  en el espacio periplásmico y en el lumen tilacoidal de células vegetativas. La Pc se ha encontrado, también, en el lumen tilacoidal de células vegetativas, aunque no se ha estudiado su posible presencia en el espacio periplásmico. Tampoco se ha estudiado la presencia de ambas proteínas en heterocistos. Así pues, en esta tesis se ha estudiado en detalle la localización subcelular de ambas proteínas, tanto en las células vegetativas como en heterocistos de *Nostoc* sp. PCC 7119. También, a pesar de que algunos estudios previos indican que ambas metaloproteínas están implicadas tanto en fotosíntesis como en respiración, aún se desconoce su función en las cadenas respiratorias y fotosintéticas de heterocistos y su implicación en la fijación de nitrógeno atmosférico. Por eso, a parte de la localización celular y subcelular, se ha realizado un estudio de la reacción de ambas proteínas con membranas de células vegetativas, en las cuales está presente Cox1, y con membranas de heterocistos, en las cuales sólo aparecen Cox2 y Cox3.

##### 4.4.1. Localización subcelular de citocromo $c_6$ y plastocianina

La localización subcelular de estas proteínas es crucial para saber dónde desempeñan la función. Ambas proteínas se transportan por un sistema de secreción tipo *sec*, con un péptido de tránsito que enviaría a las proteínas a los mismos sistemas de membrana. Para localizar estas proteínas se han

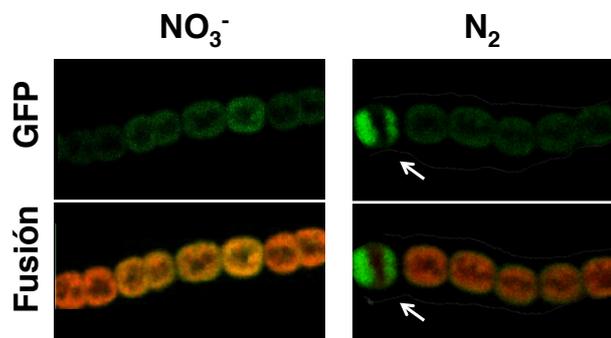
realizado fusiones traduccionales con la proteína *sf-GFP* que se han visualizado con un microscopio confocal. Como vemos en la Figura 48, en células vegetativas, el Cit  $c_6$  se localizaría en el lumen tilacoidal y en el espacio periplásmico, mientras que la Pc solo la encontramos en el lumen tilacoidal. En heterocistos, sin embargo, ambas proteínas co-localizan en las estructuras de membrana denominadas *honeycombs*. En estas estructuras es donde el heterocisto acumula las oxidasas terminales Cox2 y Cox3, así como el Cit  $b_6-f$  y el PS I.



**Figura 48. Localización subcelular del citocromo  $c_6$  y de la plastocianina de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Las condiciones ensayadas fueron BG11 completo ( $\text{NO}_3^-$ ) y BG11<sub>0</sub> ( $\text{N}_2$ ), en cuyo caso el organismo desarrollaba heterocistos. Para el caso concreto del Cit  $c_6$ , las células se cultivaron en ausencia total de cobre, para evitar la represión del gen. Se muestra el campo fluorescente de la *sf-GFP* (GFP) y la fusión de este con el campo rojo de la clorofila (Fusión). Todas las fotografías constan del mismo aumento. La flecha blanca señala un heterocisto.

Estos experimentos están realizados en condiciones de presencia (para el caso de la Pc) o ausencia (para el caso del Cit  $c_6$ ) de cobre. Sin embargo, también se realizaron estudios de localización subcelular en las condiciones inversas. En el caso de la Pc en ausencia de cobre, fuimos incapaces de localizar la

proteína en ninguna condición (no se muestran los datos); algo esperable, ya que la expresión de la Pc está altamente reprimida en ausencia de cobre [Bovy *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994]. Sin embargo, en el caso del Cit  $c_6$ , cuya expresión está fuertemente reprimida por la presencia de cobre [Bovy *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994], encontramos unos niveles de expresión altos en presencia de cobre, pero sólo en los heterocistos (Figura 49). En el resto del filamento apenas encontramos la proteína.

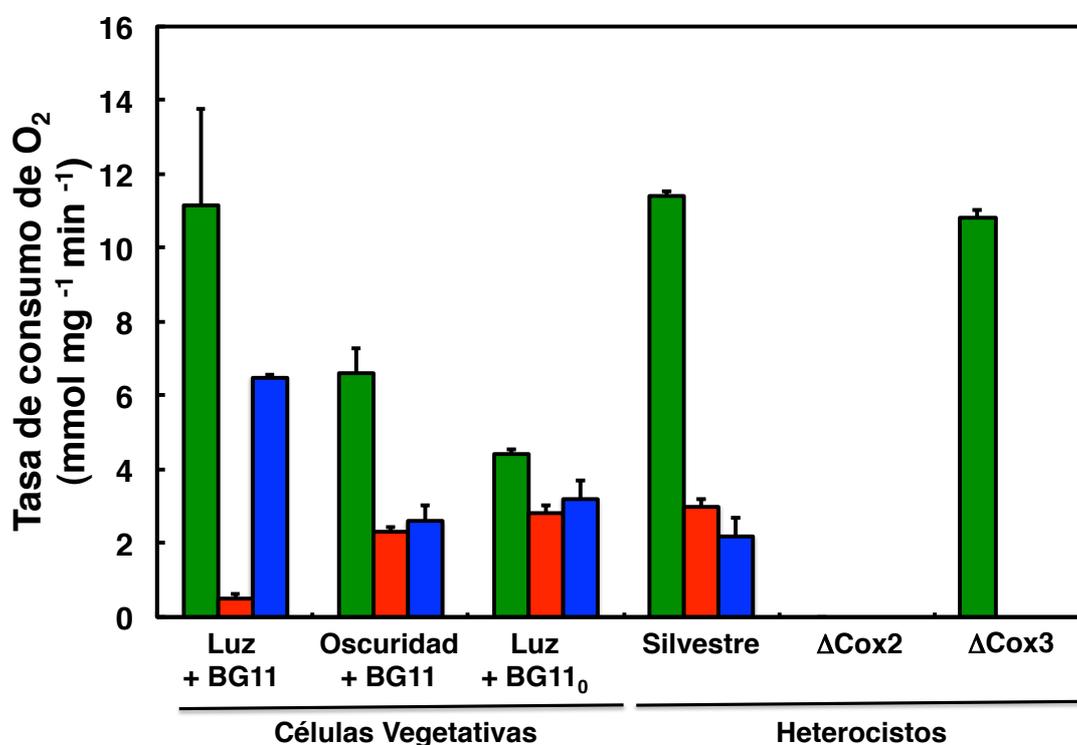


**Figura 49. Localización subcelular del citocromo  $c_6$  de *Nostoc* sp. PCC 7119 en presencia de cobre.** Las condiciones ensayadas fueron BG11 completo ( $\text{NO}_3^-$ ) y BG11<sub>0</sub> ( $\text{N}_2$ ), en cuyo caso el organismo desarrollaba heterocistos. Se muestra el campo fluorescente de la *sf-GFP* (GFP) y la fusión de este con el campo rojo de la clorofila (Fusión). Todas las fotografías constan del mismo aumento. La flecha blanca señala un heterocisto.

Como se deduce de los datos expuestos, la Pc sólo se expresa en presencia de cobre y lo hace en el lumen tilacoidal de células vegetativas y en los *honeycombs* de heterocistos. Por otro lado, el Cit  $c_6$ , en ausencia de cobre, se expresa en el espacio periplásmico y en el lumen tilacoidal de células vegetativas, y en los *honeycombs* de heterocistos. En presencia de cobre, la expresión del Cit  $c_6$  se reprime en el lumen tilacoidal de células vegetativas, pero sigue expresándose en el espacio periplásmico de éstas y en los *honeycombs* de heterocistos.

#### 4.4.2. Reacción del citocromo $c_6$ y la plastocianina con las oxidasas terminales Cox1, Cox2 y Cox3

En primer lugar, se estudió la reacción de ambos donadores de electrones con membranas enriquecidas en oxidasas terminales, como ya hemos visto para los otros Cit estudiados y después, se decidió incluir membranas enriquecidas en oxidasas terminales de los mutantes simples de delección de las oxidasas de heterocistos Cox2 y Cox3 (Figura 50).



**Figura 50. Reacción del citocromo  $c_6$  y plastocianina con oxidasas terminales de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7119.** Tasas de consumo de oxígeno en presencia de Cit  $c_6$  (Verde), de la Pc (Azul) y de Cit  $c$  de caballo (Rojo) con membranas extraídas de cultivos de *Nostoc* sp. PCC 7119 en las siguientes condiciones: luz con medio BG11 completo (Luz + BG11), oscuridad con medio BG11 completo (Oscuridad + BG11), luz con medio BG11<sub>0</sub> sin nitrógeno combinado (Luz + BG11<sub>0</sub>), de esta última condición se realizó un aislamiento de heterocistos y posteriormente se hizo una extracción de membranas de estas células (Heterocistos) para el silvestre, así como de los mutantes de las oxidasas Cox2 ( $\Delta$ Cox2) y Cox3 ( $\Delta$ Cox3). Las barras de error se calcularon a partir de la media de tres réplicas.

Como se observa en la Figura 50, el Cit  $c_6$  es capaz de reaccionar de forma eficiente con la oxidasa principal de células vegetativas, la Cox1. Además, reacciona de forma específica con la oxidasa terminal del heterocisto Cox2, ya que mutantes de delección de estas oxidasas no muestran reactividad con el Cit  $c_6$  y no reacciona con la Cox3. En el caso de la Pc, vemos que también hay una buena reactividad entre esta proteína y la oxidasa Cox1. Sin embargo, es interesante ver que no es capaz de reaccionar de forma específica con las oxidasas terminales de heterocistos, lo que sugiere que la función de la Pc en el heterocisto no sería respiratoria, ya que como hemos comentado, la oxidasa terminal Cox1 no está presente en heterocistos.

En resumen, tendríamos que cuando hay cobre presente en el medio, la Pc se expresaría tanto en células vegetativas como en heterocistos, mientras que el Cit  $c_6$  se seguiría expresando en heterocistos. En ausencia de cobre, no se expresaría la Pc, mientras que el Cit  $c_6$  se expresaría en células vegetativas y heterocistos, siendo además en este tipo celular donde encontramos una mayor expresión de la proteína. Así mismo, el Cit  $c_6$  sería el único donante de electrones soluble en *Nostoc* sp. PCC 7119 capaz de reaccionar con la oxidasa terminal Cox2 de heterocistos, ya que en este tipo celular es necesaria una alta actividad respiratoria, que es incapaz de cubrir la Pc. Además, el Cit  $c_6$  se puede localizar en el espacio periplásmico de las células vegetativas, donde se localiza una cadena respiratoria alternativa, mientras que la Pc solo se localiza en el lumen tilacoidal.

## CONSIDERACIONES GENERALES



## 5. CONSIDERACIONES GENERALES

El Cit  $c_6$ , cuya principal función es transferir electrones desde el complejo Cit  $b_6-f$  hasta el PS I (fotosíntesis) o hasta las oxidasas terminales (respiración) [Sandmann, 1985], se encuentra presente en todas las cianobacterias cuyo genoma ha sido secuenciado [Schmetterer, 1994; Ki 2005]. Alternativamente, en muchas cianobacterias esta función la lleva a cabo la Pc, que reemplaza al Cit  $c_6$  en presencia de cobre en el medio. Algo similar ocurre en algas verdes, mientras que en plantas superiores la Pc ha reemplazado completamente al Cit  $c_6$  [Davis *et al.*, 1980].

El gran número de genomas de organismos fotosintéticos recientemente secuenciados ha permitido encontrar una serie de secuencias codificantes similares al Cit  $c_6$  en algunas cianobacterias, algas verdes e incluso plantas. Es interesante el hecho de que en todas las cianobacterias secuenciadas se puede encontrar una copia del denominado Cit  $c_M$  [Malakhov *et al.*, 1994], cuya función se propuso que podría estar relacionada con la respiración [Manna y Vermaas, 1997], a pesar de ser incapaz de interactuar con el Cit  $f$  [Molina-Heredia *et al.*, 2002]. Sin embargo, los resultados de esta tesis descartan esta posible función, ya que el Cit  $c_M$  no interacciona eficientemente con la Cox1. Además de los genes que codifican para el Cit  $c_6$  canónico o para el Cit  $c_M$ , multitud de cianobacterias presentan el Cit  $c_{6-2}$  [Bialek *et al.*, 2008; Reyes-Sosa *et al.*, 2011], e incluso, como hemos descrito en este trabajo, un tercer Cit, el Cit  $c_{6-3}$ , que está presente sólo en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos [Torrado *et al.* 2016]. Por lo tanto, en cianobacterias como *Nostoc* sp. PCC 7119, cuyas cadenas de transporte fotosintética y respiratoria se encuentran localizadas en los mismos sistemas de membranas [Blankenship, 1992], encontramos genes codificantes de cuatro citocromos solubles que podrían aportar una gran versatilidad al metabolismo de estas cianobacterias. Está bien descrito el papel fotosintético o respiratorio del Cit  $c_6$  y Pc, mientras que poco o nada se conocía de estos citocromos alternativos hasta este trabajo.

#### 4.5. Localización subcelular de los citocromos alternativos

A la hora de establecer la posible función de estos Cit, es muy importante conocer la localización de estas proteínas, así como saber cuáles son sus niveles de expresión relativos. Respecto al Cit  $c_{6-2}$  o al Cit  $c_M$ , pese a numerosos intentos de determinar su localización subcelular en las condiciones de cultivo estudiadas, sólo se pudo detectar su presencia en el organismo. Esto es debido al bajo nivel de expresión de dichas proteínas, lo que nos conduce a pensar que no jugarán un papel determinante como proteínas de transferencia de electrones masiva.

En relación al Cit  $c_{6-3}$ , sí que encontramos unos niveles de proteína significativos, pero no suficientes como para establecer una localización subcelular definitiva. Cabe destacar que esta proteína se encuentra únicamente en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, por lo que en principio podría jugar algún tipo de papel en el desarrollo y función del heterocisto o como regulador del metabolismo del nitrógeno. Por ello, se realizaron estudios en presencia o ausencia de nitrógeno combinado, resultando que, en presencia de nitrógeno combinado, la expresión de la proteína es inferior en heterocistos que en células vegetativas. Esto es muy llamativo ya que, según los datos de reacción con las oxidasas específicas de heterocistos y el hecho de que esta proteína solo esté presente en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, esperábamos lo opuesto. Park y colaboradores [2013] publicaron un análisis del genoma de *A. variabilis*, una cianobacteria similar a *Nostoc*, bajo diferentes condiciones diazotróficas y encontraron que el gen *petJ-3* aumentaba su expresión en condiciones de deficiencia de nitrógeno, aunque como ya hemos comentado, los datos obtenidos sobre cantidad de proteína total *in vivo* nos induzcan a concluir lo contrario.

A modo de conclusión podemos afirmar que los niveles de expresión de los Cit  $c_M$  y  $c_{6-2}$  son muy bajos en las condiciones de cultivo que hemos estudiado,

llegando al nivel de la autofluorescencia del silvestre, por lo que no podemos concretar la localización subcelular. Respecto al Cit  $c_{6-3}$ , concluimos que la proteína se expresa en células vegetativas en presencia de nitrógeno combinado. Sin embargo, cuando la célula entra en condiciones de crecimiento diazotrófico y desarrolla heterocistos, los niveles de Cit  $c_{6-3}$  disminuyen sensiblemente en el heterocisto. En cualquier caso, los niveles de expresión del Cit  $c_{6-3}$  son muy inferiores a los del Cit  $c_6$  y no presentan ningún tipo de regulación por cobre.

#### 4.6. Posible función de los citocromos alternativos en fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los procesos estudiados en relación a los Cit alternativos, ya que el Cit  $c_6$  es uno de los principales transportadores de electrones desde el Cit  $b_6-f$  hasta el PS I. La presencia de estos Cit alternativos abriría la posibilidad de que en cianobacterias como *Nostoc* pudiesen jugar un papel accesorio en este proceso fisiológico.

El Cit  $c_{6-2}$ , como describieron Reyes-Sosa y colaboradores [2011], es capaz de interaccionar con el PS I de forma relativamente eficiente, aunque con cinéticas muy inferiores al Cit  $c_6$  o a la Pc, sus principales donadores fisiológicos en la cadena fotosintética. Sin embargo, el bajo potencial rédox de esta proteína le impide ser capaz de captar electrones desde el Cit  $f$ , aunque sí que le permitiría donárselos. Esto, unido a la baja cantidad de proteína observada, imposible de localizar con la proteína reportera *GFP*, descarta al Cit  $c_{6-2}$  como transportador de electrones en fotosíntesis. Por ello, aunque se podría especular sobre si este Cit podría desempeñar, o no, un papel en la fotosíntesis, como algún tipo de sensor o regulador, queda descartado como un donador fotosintético masivo.

Respecto a los citocromos  $c_{6-3}$  y  $c_M$ , tras los estudios cinéticos realizados, concluimos que no interaccionan eficientemente con el PS I, ya que las

cinéticas de transferencia de electrones son tan lentas que no entrarían en el rango de lo fisiológicos. Por lo tanto, el único Cit alternativo con un posible papel en fotosíntesis sería el Cit  $c_{6-2}$ .

#### 4.7. Posible función de los citocromos alternativos en respiración

La respiración, vía oxidasas terminales, es un proceso clave dentro de las cianobacterias, aunque hay numerosas incógnitas que aún queda por resolver. En estudios de consumo de oxígeno en los que se incluyen las oxidasas terminales de células vegetativas y de heterocistos, vemos que el Cit  $c_{6-2}$  es incapaz de reaccionar con cualquiera de ellas. Por otra parte, encontramos resultados interesantes respecto a Cit  $c_{6-3}$  y Cit  $c_M$ . Ninguna de las dos proteínas reacciona eficientemente con la Cox1, que es la oxidasa específica de las células vegetativas. Ambas proteínas podrían reaccionar con las oxidasas terminales específicas de heterocistos, el Cit  $c_{6-3}$  con una eficiencia similar al Cit  $c_6$  y el Cit  $c_M$  con una eficiencia inferior. Sin embargo, con mutantes de delección de las dos únicas oxidasas terminales presentes en el heterocisto, encontramos que ninguna de las dos proteínas reaccionan. El hecho de que se necesiten ambas oxidasas para que exista un consumo de oxígeno nos conduce a pensar que debe haber algún tipo de interacción más compleja que la interacción Cit-Cox o una interacción indirecta que aún no está caracterizada.

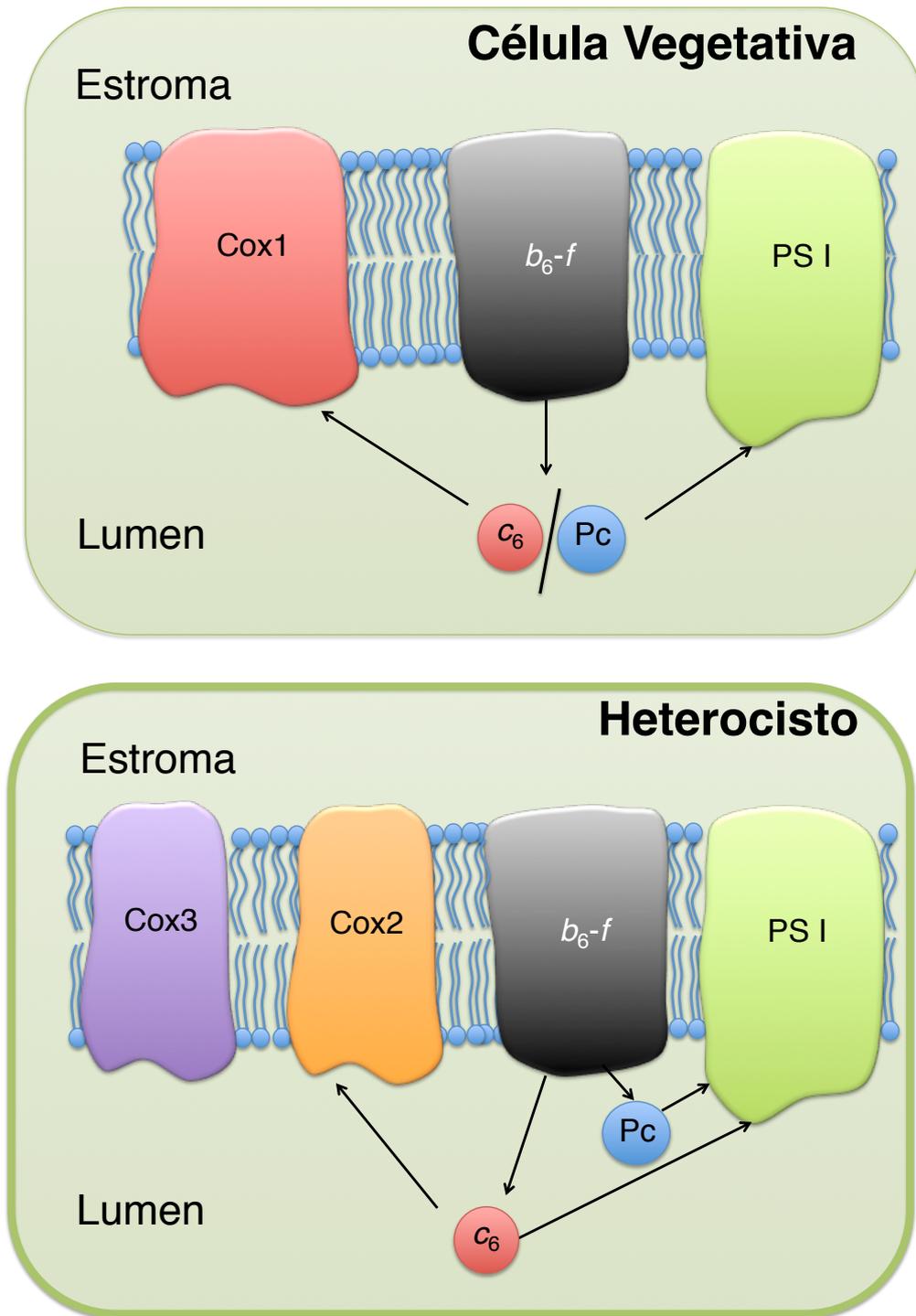
En resumen, a pesar de que otros autores proponían que el Cit  $c_M$  estaba involucrado en respiración [Manna y Vermaas, 1997], los resultados de este trabajo descartan esa hipótesis. Sin embargo, el hecho de que en los experimentos de evolución de oxígeno con membranas de heterocistos, la presencia de tanto el Cit  $c_M$  como el Cit  $c_{6-3}$  promuevan el consumo de oxígeno, indica que pueden estar relacionados indirectamente con la respiración en el interior del heterocisto. En cambio, mientras que el Cit  $c_6$  reacciona con la Cox2, incluso en mutantes *knock-out* de la Cox3, Cit  $c_M$  y Cit  $c_{6-3}$  sólo

promueven el consumo de oxígeno en presencia de ambas oxidasas. Esto nos indica que mientras que el Cit  $c_6$  actuaría como un Cit respiratorio en el heterocisto, los Cit  $c_M$  y Cit  $c_{6-3}$  no jugarían un papel esencial en respiración y, en el caso de intervenir en este proceso, no sería como transportador masivo de electrones como el Cit  $c_6$ .

#### **4.8. Papel del citocromo $c_6$ y de la plastocianina en fotosíntesis y respiración**

Como parte de este trabajo, también se procedió a la localización subcelular del Cit  $c_6$  y la Pc, ya que a pesar de estar bien caracterizados, al inicio de esta tesis sólo se conocía que la localización del Cit  $c_6$  era en el lumen tilacoidal y el espacio periplásmico de células vegetativas [Öbinger *et al.*, 1990; Serrano *et al.*, 1990] mientras que la Pc sólo se había localizado en el lumen tilacoidal de células vegetativas [Öbinger *et al.*, 1990]. No se sabía si la Pc se encontraba, o no, al igual que el Cit  $c_6$ , en el espacio periplásmico, y tampoco había ningún dato sobre su posible localización en heterocistos.

En estos estudios encontramos que, como ya se había descrito previamente, Cit  $c_6$  y Pc se localizan en el lumen tilacoidal de células vegetativas de *Nostoc*, algo ya esperado si analizamos su péptido de tránsito (Figura 51). Además confirmamos que el Cit  $c_6$  se localiza en el espacio periplásmico. En cambio no encontramos a la Pc en el espacio periplásmico. Se ha descrito que en la membrana plasmática, que está en contacto con el espacio periplásmico, se localiza un sistema respiratorio alternativo [Valladares *et al.*, 2007]. Estos datos indicarían que sería el Cit  $c_6$ , y no la Pc, el posible transportador de electrones soluble de esta cadena de transporte de electrones alternativa.



**Figura 51. Esquema funcional propuesto para el citocromo  $c_6$  y la plastocianina y su relación en fotosíntesis y respiración en *Nostoc* sp. PCC 7119.** Se representan los dos tipos celulares de esta cianobacteria en condiciones diazotróficas, células vegetativas y heterocistos. PS I: fotosistema I;  $b_6-f$ : complejo de citocromos  $b_6-f$ ; Cox1: oxidasa terminal vegetativa; Cox2, Cox3: oxidasas terminales de heterocistos; Pc: plastocianina;  $c_6$ : citocromo  $c_6$ .

Analizando la localización en condiciones diazotróficas, encontramos que ambas proteínas se localizan en los heterocistos, y más concretamente en los *honeycombs*. Esto era esperable, ya que en estas estructuras de membrana es donde se acumulan las principales dianas de estas dos proteínas, el complejo Cit  $b_6-f$ , el PS I y las oxidasas terminales. En ausencia de cobre, sólo aparece el Cit  $c_6$ , tanto en las células vegetativas como en los *honeycombs*. Sin embargo, aunque en presencia de cobre es la Pc la que se expresa tanto en las células vegetativas como en los *honeycombs* y el Cit  $c_6$  prácticamente desaparece del lumen tilacoidal de células vegetativas, sí continua expresándose en una alta concentración en los *honeycombs*. Es decir, en los *honeycombs*, en ausencia de cobre, sólo aparece el Cit  $c_6$ , pero en presencia de cobre se co-expresan ambos donadores: Cit  $c_6$  y Pc. Desde un punto de vista funcional, tanto el Cit  $c_6$  como la Pc interactúan eficientemente con el PS I [Hope, 2000; Fromme *et al.*, 2003]; en cambio, sólo el Cit  $c_6$  es capaz de interactuar con las oxidasas terminales presentes en los heterocistos, concretamente con la Cox2. Por lo tanto, tendríamos un escenario en el cual, en el heterocisto, en presencia de cobre, la Pc sólo funcionaría en fotosíntesis y el Cit  $c_6$  en respiración, aunque el Cit  $c_6$  podría actuar también en fotosíntesis. De hecho, en ausencia de cobre el Cit  $c_6$  sería el único donante de electrones al PS I y a la Cox2 presente en los heterocistos.



## CONCLUSIONES



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de tesis han sido las siguientes:

1. Se ha encontrado una nueva isoforma del Cit  $c_6$  que sólo está presente en cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, el Cit  $c_{6-3}$ .
2. El Cit  $c_{6-3}$  podría ser capaz de aceptar o ceder electrones al Cit  $f$ , pero no es capaz de interactuar eficientemente con el PS I, en comparación con el donador fisiológico Cit  $c_6$ .
3. El Cit  $c_{6-3}$  no intervendría en la cadena respiratoria de células vegetativas mediada por la oxidasa Cox1, aunque sí podría jugar un papel indirecto en la cadena respiratoria de heterocistos.
4. El Cit  $c_{6-3}$  se expresa en las células vegetativas, reprimiéndose en el heterocisto en condiciones diazotróficas. Los bajos niveles de expresión del Cit  $c_{6-3}$  indican que no se trataría de un transportador masivo de electrones, aunque no se descarta un papel regulatorio.
5. El Cit  $c_{6-2}$  sería capaz de donar electrones al PS I, pero no a las oxidasas terminales de la cadena respiratoria.
6. El Cit  $c_{6-2}$  podría interactuar con el Cit  $f$ , pero por su potencial rédox no sería capaz de oxidarlo, aunque sí de reducirlo.
7. El Cit  $c_M$  es incapaz de interactuar de forma eficiente con el Cit  $f$  y el PS I.
8. El Cit  $c_M$ , que se había postulado como Cit respiratorio, no reacciona con las oxidasas respiratorias de células vegetativas.
9. El Cit  $c_6$  se localiza en el espacio periplásmico y en el lumen tilacoidal de células vegetativas, así como en los *honeycombs* de heterocistos, mientras que la Pc se localiza exclusivamente en el lumen tilacoidal de células vegetativas y en los *honeycombs* de heterocistos.

10. El Cit  $c_6$  se expresa en los *honeycombs* independientemente de la presencia o ausencia de cobre en el medio.
11. El Cit  $c_6$  intervendría en la cadena respiratoria de células vegetativas vía Cox1 y en la de heterocistos vía Cox2; en cambio, la Pc solo intervendría en la cadena respiratoria de células vegetativas.
12. En presencia de cobre en el medio y ausencia de nitrógeno combinado, el Cit  $c_6$  actuaría como donador de electrones tanto en la cadena respiratoria como en fotosintética de heterocistos; sin embargo, la Pc sólo sería capaz de ceder electrones al PS I.
13. En ausencia de cobre y de nitrógeno combinado en el medio, el Cit  $c_6$  sería el único transportador de electrones masivo en heterocistos.

**BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* **229**(4):767-779.

Adachi J & Hasegawa M (1992) MOLPHY version 2.3: Programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood. *Computer Science Monographs* **28**:1-77.

Adam Z & Malkin R (1989) On the interaction between cytochrome *f* and plastocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**(1):158-163.

Adolph KW & Haselkorn R (1971) Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Virology* **46**(2):200-208.

Albarrán C, Navarro JA, Molina-Heredia FP, Murdoch PS, De la Rosa MA & Hervás M (2005) Laser flash-induced kinetic analysis of cytochrome *f* oxidation by wild-type and mutant plastocyanin from the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. *Biochemistry* **44**(34):11601-11607.

Alting-Mees MA & Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research* **17**(22):9494.

Alting-Mees MA, Sorge JA & Short JM (1992) pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods in Enzymology* **216**:483-495.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**(3):403-410.

Anderson GP, Sanderson DG, Lee CH, Durell S, Anderson LB & Gross EL (1987) The effect of ethylenediamine chemical modification of plastocyanin on the rate of cytochrome *f* oxidation and P-700<sup>+</sup> reduction. *Biochimica et Biophysica Acta* **894**(3):386-398.

Arnon DI (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology* **24**(1):1-15.

Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Künzler P & Thöny-Meyer L (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**(3):744-747.

Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN & Tirtiaux C (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of Experimental Botany* **62**(6):1775-1801.

Beissinger M, Sticht H, Sutter M, Ejchart A, Haehnel W & Rösch P (1998) Solution structure of cytochrome *c*<sub>6</sub> from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *The EMBO Journal* **17**(1):27-36.

Bendall DS & Manasse RS (1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1229**(1):23-38.

Bernroitner M, Tangl D, Lucini C, Furtmüller PG, Peschek GA & Obinger C (2009) Cyanobacterial cytochrome *c*<sub>M</sub>: probing its role as electron donor for Cu<sub>A</sub> of cytochrome *c* oxidase. *Biochimica et biophysica acta* **1787**(3):135-143.

Berry EA & Trumpower BL (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra. *Analytical Biochemistry* **161**(1):1-15.

Betts JN, Beratan DN & Onuchic JN (1992) Mapping electron tunneling pathways: an algorithm that finds the "Minimum length"/maximum coupling pathway between electron donors and acceptors in proteins. *Journal of the American Chemical Society* **114**:4043-4046.

Bialek W, Nelson M, Tamiola K, Kallas T & Szczepaniak A (2008) Deeply branching  $c_6$ -like cytochromes of cyanobacteria. *Biochemistry* **47(20)**:5515-5522.

Blankenship RE (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* **33**:91-111.

Borck K, Beggs JD, Brammar WJ, Hopkins AS & Murray NE (1976) The construction *in vitro* of transducing derivatives of phage lambda. *Molecular & General Genetics : MGG* **146(2)**:199-207.

Bovy A, de Vrieze G, Borrias M & Weisbeek P (1992) Isolation and sequence analysis of a gene encoding a basic cytochrome  $c$ -553 from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7937. *Plant Molecular Biology* **19(3)**:491-492.

Bovy A, de Vrieze G, Borrias M & Weisbeek P (1992) Transcriptional regulation of the plastocyanin and cytochrome  $c_{553}$  genes from the cyanobacterium *Anabaena* species PCC 7937. *Molecular Microbiology* **6(11)**:1507-1513.

Boyer HW & Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41(3)**:459-472.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.

Brettell K (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1318(3)**:322-373.

Brown AH & Webster GC (1953) The influence of light on the rate of respiration of the blue-green alga *Anabaena*. *American Journal of Botany* **40(10)**:753-758.

Cai YP & Wolk CP (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *Journal of Bacteriology* **172(6)**:3138-3145.

Cameron JC, Wilson SC, Bernstein SL & Kerfeld CA (2013) Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* **155(5)**:1131-1140.

Campos AP, Aguiar AP, Hervás M, Regalla M, Navarro JA, Ortega JM, Xavier AV, De la Rosa MA & Teixeira M (1993) Cytochrome  $c_6$  from *Monoraphidium braunii*. A cytochrome with an unusual heme axial coordination. *European Journal of Biochemistry* **216(1)**:329-341.

Casadaban MJ & Cohen SN (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **138(2)**:179-207.

Cavalier-Smith T (2006) Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences* **273(1596)**:1943-1952.

Cho YS, Pakrasi HB & Whitmarsh J (2000) Cytochrome  $c_M$  from *Synechocystis* 6803. Detection in cells, expression in *Escherichia coli*, purification and physical characterization. *European Journal of Biochemistry* **267(4)**:1068-1074.

Cohn CL, Hermodson MA & Krogmann DW (1989) The amino acid sequence of cytochrome  $c_{553}$  from *Microcystis aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **270**(1):219-226.

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S & Camacho CJ (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research* **32**:W96-99.

Crowley PB, Díaz-Quintana A, Molina-Heredia FP, Nieto P, Sutter M, Haehnel W, De la Rosa MA & Ubbink M (2002) The interactions of cyanobacterial cytochrome  $c_6$  and cytochrome  $f$ , characterized by NMR. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(50):48685-48689.

Cserző M, Wallin E, Simon I, von Heijne G & Elofsson A (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering* **10**(6):673-676.

Davis DJ, Krogmann DW & Pietro AS (1980) Electron donation to photosystem I. *Plant Physiology* **65**(4):697-702.

De la Cerda B, Navarro JA, Hervás M & De la Rosa MA (1997) Changes in the reaction mechanism of electron transfer from plastocyanin to photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as induced by site-directed mutagenesis of the copper protein. *Biochemistry* **36**(33):10125-10130.

De la Rosa MA, Molina-Heredia FP, Hervás M & Navarro JA (2006) Convergent evolution of cytochrome  $c_6$  and plastocyanin. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, ed Goldbeck JH (Springer, Dordrecht), Vol **24**, pp 683-694.

De la Rosa MA, Navarro JA, Díaz-Quintana A, De la Cerda B, Molina-Heredia FP, Balme A, Murdoch Pdel S, Díaz-Moreno I, Durán R & Hervás M (2002) An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome  $c_6$  and plastocyanin. *Bioelectrochemistry* **55(1-2)**:41-45.

Deusch O, Landan G, Roettger M, Gruenheit N, Kowallik KV, Allen JF, Martin W & Dagan T (2008) Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Molecular Biology and Evolution* **25(4)**:748-761.

Díaz A, Hervás M, Navarro JA, De la Rosa MA & Tollin G (1994) A thermodynamic study by laser-flash photolysis of plastocyanin and cytochrome  $c_6$  oxidation by photosystem I from the green alga *Monoraphidium braunii*. *European Journal of Biochemistry* **222(3)**:1001-1007.

Díaz-Moreno I, Díaz-Quintana A, Molina-Heredia FP, Nieto PM, Hansson Ö, De la Rosa MA & Karlsson BG (2005a) NMR analysis of the transient complex between membrane photosystem I and soluble cytochrome  $c_6$ . *The Journal of Biological Chemistry* **280(9)**:7925-7931.

Díaz-Moreno I, Díaz-Quintana A, Ubbink M & De la Rosa MA (2005b) An NMR-based docking model for the physiological transient complex between cytochrome  $f$  and cytochrome  $c_6$ . *FEBS letter* **579(13)**:2891-2896.

Díaz-Moreno I, Hulsker R, Skubak P, Foerster JM, Cacazzini D, Finiguerra MG, Díaz-Quintana A, Moreno-Beltrán B, Rossi GL, Ullmann GM, Pannu NS, De la Rosa MA & Ubbink M (2014) The dynamic complex of cytochrome  $c_6$  and cytochrome  $f$  studied with paramagnetic NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1837**:1305-1315.

Dong X, Stothard P, Forsythe IJ & Wishart DS (2004) PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Research* **1:32**(Web Server issue):W660-4.

Donze M, Haveman J & Schiereck P (1972) Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochimica et Biophysica Acta* **256**(1):157-161.

Durán RV, Hervás M, De la Rosa MA & Navarro JA (2004) The efficient functioning of photosynthesis and respiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strictly requires the presence of either cytochrome  $c_6$  or plastocyanin. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(8):7229-7233.

Durán RV, Hervás M, De la Rosa MA & Navarro JA (2005) *In vivo* photosystem I reduction in thermophilic and mesophilic cyanobacteria: the thermal resistance of the process is limited by factors other than the unfolding of the partners. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **334**(1):170-175.

Durell SR, Labanowski JK & Gross EL (1990) Modeling of the electrostatic potential field of plastocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **277**(2):241-254.

Dutton PL & Wilson DF (1974) Redox potentiometry in mitochondrial and photosynthetic bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta* **346**(2):165-212.

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. *Journal of Bacteriology* **179**(6):1998-2005.

Elhai J & Wolk CP (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymology* **167**:747-754.

Fabianek RA, Hennecke H & Thöny-Meyer L (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome *c* maturation *in vivo*. *Journal of Bacteriology* **180**(7):1947-1950.

Fay P (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56**(2):340-373.

Flores E & Herrero A (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. *Advances in Photosynthesis. The Molecular Biology of Cyanobacteria*, ed Bryant DA (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp 487-517.

Flores E & Herrero A (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews. Microbiology* **8**(1):39-50.

Frazão C, Soares CM, Carrondo MA, Pohl E, Dauter Z, Wilson KS, Hervás M, Navarro JA, De la Rosa MA & Sheldrick GM (1995) *Ab initio* determination of the crystal structure of cytochrome *c*<sub>6</sub> and comparison with plastocyanin. *Structure* **3**(11):1159-1169.

Fromme P, Melkozernov A, Jordan P & Krauss N (2003) Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Letters* **555**(1):40-44.

Gasteiger J (2006) Chemoinformatics: a new field with a long tradition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**(1):57-64.

Giddings TH & Staehelin LA (1978) Plasma membrane architecture of *Anabaena cylindrica*: occurrence of microplasmodesmata and changes

associated with heterocyst development and the cell cycle. *Cytobiologie* **16**:235-249.

Giddings TH & Staehelin LA (1981) Observations of microplasmodesmata in both, heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron microscopy. *Archives of Microbiology* **129**:295-298.

Green MR & Sambrook J (2012) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) Fourth Edition.

Guerrero MG & Lara C (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. *The Cyanobacteria*, eds Fay P & van Baalen C (Elsevier Science Publishers, New York), pp 163-186.

Guex N & Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18(15)**:2714-2723.

Gupta R, He Z & Luan S (2002) Functional relationship of cytochrome  $c_6$  and plastocyanin in *Arabidopsis*. *Nature* **417(6888)**:567-571.

Guss JM, Bartunik HD & Freeman HC (1992) Accuracy and precision in protein structure analysis: restrained least-squares refinement of the structure of poplar plastocyanin at 1.33 Å resolution. *Acta Crystallographica Section B* **48(Pt6)**:790-811.

Guss JM & Freeman HC (1983) Structure of oxidized poplar plastocyanin at 1.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **169(2)**:521-563.

Guss JM, Harrowell PR, Murata M, Norris VA & Freeman HC (1986) Crystal structure analyses of reduced (CuI) poplar plastocyanin at six pH values. *Journal of Molecular Biology* **192(2)**:361-387.

Haehnel W, Jansen T, Gause K, Klösigen RB, Stahl B, Michl D, Huvermann B, Karas M & Herrmann RG (1994) Electron transfer from plastocyanin to photosystem I. *The EMBO journal* **13(5)**:1028-1038.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166(4)**:557-580.

Haselkorn R (1978) Heterocyst. *Annual Review of Plant Physiology* **29(1)**:319-344.

He S, Modi S, Bendall DS & Gray JC (1991) The surface-exposed tyrosine residue Tyr83 of pea plastocyanin is involved in both binding and electron transfer reactions with cytochrome *f*. *The EMBO journal* **10(13)**:4011-4016.

Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A & Flores E (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS microbiology reviews* **28(4)**:469-487.

Hervás M, Navarro JA & De la Rosa MA (2003) Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Accounts of chemical research* **36(10)**:798-805.

Hervás M, Navarro JA, Díaz A, Bottin H & De la Rosa MA (1995) Laser-flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome  $c_6$  to photosystem I. Experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism. *Biochemistry* **34(36)**:11321-11326.

Hervás M, Ortega JM, Navarro JA, De la Rosa MA & Bottin H (1994) Laser flash kinetic analysis of *Synechocystis* PCC 6803 cytochrome  $c_6$  and plastocyanin oxidation by Photosystem I. *Biochimica et biophysica acta-Bioenergetics* **1184(2-3)**:235-241.

Hill KL & Merchant S (1992) *In Vivo* Competition between Plastocyanin and a Copper-Dependent Regulator of the *Chlamydomonas reinhardtii* Cytochrome  $c_6$  Gene. *Plant physiology* **100**(1):319-326.

Hiraide Y, Oshima K, Fujisawa T, Uesaka K, Hirose Y, Tsujimoto R, Yamamoto H, Okamoto S, Nakamura Y, Terauchi K, Omata T, Ihara K, Hattori M & Fujita Y (2015) Loss of cytochrome  $c_M$  stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant & Cell Physiology* **56**(2):334-345.

Hoiczuk E & Hansel A (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* **182**(5):1191-1199.

Hoover DM & Lubkowski J (2002) DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research* **30**(10):e43.

Hope AB (2000) Electron transfers amongst cytochrome  $f$ , plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1456**(1):5-26.

Howe G & Merchant S (1994) Role of heme in the biosynthesis of cytochrome  $c_6$ . *The Journal of Biological Chemistry* **269**(8):5824-5832.

Jones KM & Haselkorn R (2002) Newly identified cytochrome  $c$  oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts. *Journal of Bacteriology* **184**(9):2491-2499.

Jürgens UJ, Drews G & Weckesser J (1983) Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *Journal of Bacteriology* **154**(1):471-478.

Käll L, Krogh A & Sonhammer ELL (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research* **35**(Web Server issue):W429-32.

Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M & Tabata S (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research* **8**(5):205-213; 227-253.

Kaplan A & Reinhold L (1999) The CO<sub>2</sub> Concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**:539-570.

Kelley LA & Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**(3):363-371.

Keren N, Kidd MJ, Penner-Hahn JE & Pakrasi HB (2002) A light-dependent mechanism for massive accumulation of manganese in the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **41**(50):15085-15092.

Keren N, Liberton M & Pakrasi HB (2005) Photochemical competence of assembled photosystem II core complex in cyanobacterial plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* **280**(8):6548-6553.

Kerfeld CA, Anwar HP, Interrante R, Merchant S & Yeates TO (1995) The structure of chloroplast cytochrome *c*<sub>6</sub> at 1.9 Å resolution: evidence for functional oligomerization. *Journal of Molecular Biology* **250**(5):627-647.

Kerfeld CA & Krogmann DW (1998) Photosynthetic cytochromes  $c$  in cyanobacteria, algae, and plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**:397-425.

Ki HK (2005) Cytochrome  $c_6$  genes in cyanobacteria and higher plants. *Handbook of Photosynthesis*, ed Pessaraki M (CRC Press, Tucson, Arizona), Second Edition Ed, pp 286-297.

Knoll A (2008) Cyanobacteria and earth history. *Cyanobacteria: Molecular Biology Genomics and Evolution*, eds Herrero A & Flores E (Caister Academic Press, Norfolk, UK), pp 1-20.

Kramer DM, Sacksteder CA & Cruz JA (1999) How acidic is the lumen? *Photosynthesis Research* **60**:151-163.

Kranz R, Lill R, Goldman B, Bonnard G & Merchant S (1998) Molecular mechanisms of cytochrome  $c$  biogenesis: three distinct systems. *Molecular Microbiology* **29**(2):383-396.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

Lang NJ & Fay P (1971) The heterocyst of blue-green algae II. Details of ultrastructure. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **178**:193-203.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, López R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21):2947-2948.

Lockau W (1981) Evidence for a dual role of cytochrome *c*-553 and plastocyanin in photosynthesis and respiration of the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. *Archives of Microbiology* **128**:336-340.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**(1):265-275.

Mackinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry* **140**:315-322.

Magnuson A & Cardona T (2016) Thylakoid membrane function in heterocysts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**(3):309-319.

Malakhov MP, Malakhova OA & Murata N (1999) Balanced regulation of expression of the gene for cytochrome *c<sub>M</sub>* and that of genes for plastocyanin and cytochrome *c<sub>6</sub>* in *Synechocystis*. *FEBS Letters* **444**(2-3):281-284.

Malakhov MP, Wada H, Los DA, Semenenko VE & Murata N (1994) A new type of cytochrome *c* from *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Plant Physiology* **144**:259-264.

Manna P & Vermaas W (1997) Lumenal proteins involved in respiratory electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology* **35**(4):407-416.

Marinus MG & Morris NR (1973) Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **114**(3):1143-1150.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL & Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* **87**(1):206-210.

Martin W & Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiology* **118**(1):9-17.

Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M & Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(19):12246-12251.

Mathis P & Sétif P (1981) Near infra-red absorption spectra of the chlorophyll a cations and triplet state *in vitro* and *in vivo*. *Israel Journal of Chemistry* **(21)**:316-320.

Medina M, Díaz A, Hervás M, Navarro JA, Gómez-Moreno C, De la Rosa MA & Tollin G (1993) A comparative laser-flash absorption spectroscopy study of *Anabaena* PCC 7119 plastocyanin and cytochrome  $c_6$  photooxidation by photosystem I particles. *European Journal of Biochemistry* **213**(3):1133-1138.

Merchant S & Bogorad L (1987) The Cu(II)-repressible plastidic cytochrome  $c$ . Cloning and sequence of a complementary DNA for the pre-apoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* **262**(19):9062-9067.

Merchant S, Hill K & Howe G (1991) Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of cyt  $c_6$ . *The EMBO Journal* **10**(6):1383-1389.

Merchant S, Hill K, Kim JH, Thompson J, Zaitlin D & Bogorad L (1990) Isolation and characterization of a complementary DNA clone for an algal pre-apoplastocyanin. *The Journal of Biological Chemistry* **265**(21):12372-12379.

Metzger SU, Pakrasi HB & Whitmarsh J (1995) Characterization of a double deletion mutant that lacks cytochrome  $c_6$  and cytochrome  $c_M$  in *Synechocystis*

6803. *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, ed Mathis P (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp 823-826.

Meyer TE, Zhao ZG, Cusanovich MA & Tollin G (1993) Transient kinetics of electron transfer from a variety of *c*-type cytochromes to plastocyanin. *Biochemistry* **32**(17):4552-4559.

Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144-148.

Modi S, Nordling M, Lundberg LG, Hansson O & Bendall DS (1992) Reactivity of cytochromes *c* and *f* with mutant forms of spinach plastocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1102**(1):85-90.

Mohamed ZA (2007) First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiology Ecology* **59**(3):749-761.

Molina-Heredia FP, Balme A, Hervás M, Navarro JA & De la Rosa MA (2002) A comparative structural and functional analysis of cytochrome  $c_M$ , cytochrome  $c_6$  and plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* **517**(1-3):50-54.

Molina-Heredia FP, Díaz-Quintana A, Hervás M, Navarro JA & De la Rosa MA (1999) Site-directed mutagenesis of cytochrome  $c_6$  from *Anabaena* species PCC 7119. Identification of surface residues of the heme protein involved in photosystem I reduction. *The Journal of Biological Chemistry* **274**(47):33565-33570.

Molina-Heredia FP, Hervás M, Navarro JA & De la Rosa MA (1998) Cloning and correct expression in *Escherichia coli* of the *petE* and *petJ* genes respectively encoding plastocyanin and cytochrome  $c_6$  from the cyanobacterium *Anabaena*

sp. PCC 7119. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243(1)**:302-306.

Molina-Heredia FP, Hervás M, Navarro JA & De la Rosa MA (2001) A single arginyl residue in plastocyanin and in cytochrome  $c_6$  from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7119 is required for efficient reduction of photosystem I. *The Journal of Biological Chemistry* **276(1)**:601-605.

Molina-Heredia FP, Wastl J, Navarro JA, Bendall DS, Hervás M, Howe CJ & De la Rosa MA (2003) Photosynthesis: a new function for an old cytochrome? *Nature* **424(6944)**:33-34.

Moore GR & Pettigrew GW (1990) *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects* (Springer-Verlag, Berlin).

Murray MA, Olafsen AG & Benemann JR (1981) Oxidation of diaminobenzidine in heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Current Microbiology* **6**:201-206.

Murray MA & Wolk CP (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends of two layers of cell envelope. *Archives of Microbiology* **151(6)**:469-474.

Nakamura M, Yamagishi M, Yoshizaki F & Sugimura Y (1992) The syntheses of plastocyanin and cytochrome  $c-553$  are regulated by copper at the pre-translational level in a green alga, *Pediastrum boryanum*. *Journal of Biochemistry* **111(2)**:219-224.

Navarro JA, Durán RV, De la Rosa MA & Hervás M (2005) Respiratory cytochrome  $c$  oxidase can be efficiently reduced by the photosynthetic redox proteins cytochrome  $c_6$  and plastocyanin in cyanobacteria. *FEBS Letters* **579(17)**:3565-3568.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S & von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10(1)**:1-6.

Nordling M, Sigfridsson K, Young S, Lundberg LG & Hansson Ö (1991) Flash-photolysis studies of the electron transfer from genetically modified spinach plastocyanin to photosystem I. *FEBS Letters* **291(2)**:327-330.

Notredame C, Higgins DG & Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* **302(1)**:205-217.

Obinger C, Knepper JC, Zimmermann U & Peschek GA (1990) Identification of a periplasmic *c*-type cytochrome as electron donor to the plasma membrane-bound cytochrome oxidase of the cyanobacterium *Nostoc* Mac. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **169(2)**:492-501.

Ochman H, Lawrence JG & Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405(6784)**:299-304.

Ortega JM, Hervás M & Losada M (1988) Redox and acid-base characterization of cytochrome *b*-559 in photosystem II particles. *European Journal of Biochemistry* **171(3)**:449-455.

Page MD, Sambongi Y & Ferguson SJ (1998) Contrasting routes of *c*-type cytochrome assembly in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Trends in Biochemical Sciences* **23(3)**:103-108.

Park JJ, Lechno-Yossef S, Wolk CP & Vieille C (2013) Cell-specific gene expression in *Anabaena variabilis* grown phototrophically, mixotrophically, and heterotrophically. *BMC Genomics* **14**:759.

Paumann M, Regelsberger G, Obinger C & Peschek GA (2005) The bioenergetic role of dioxygen and the terminal oxidase(s) in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1707(2-3)**:231-253.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC & Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25(13)**:1605-1612.

Pils D, Wilken C, Valladares A, Flores E & Schmetterer G (2004) Respiratory terminal oxidases in the facultative chemoheterotrophic and dinitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis* strain ATCC 29413: characterization of the *cox2* locus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1659(1)**:32-45.

Porter RD (1986) Transformation in cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **13(2)**:111-132.

Qin L & Kostic NM (1992) Electron-transfer reactions of cytochrome *f* with flavin semiquinones and with plastocyanin. Importance of protein-protein electrostatic interactions and of donor-acceptor coupling. *Biochemistry* **31(22)**:5145-5150.

Raven JA, Beardall J, Flynn KJ & Maberly SC (2009) Phagotrophy in the origins of photosynthesis in eukaryotes and as a complementary mode of nutrition in phototrophs: relation to Darwin's insectivorous plants. *Journal of Experimental Botany* **60(14)**:3975-3987.

Redinbo MR, Yeates TO & Merchant S (1994) Plastocyanin: structural and functional analysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26(1)**:49-66.

Reyes-Prieto A, Weber AP & Bhattacharya D (2007) The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annual Review of Genetics* **41**:147-168.

Reyes-Sosa FM, Gil-Martínez J & Molina-Heredia FP (2011) Cytochrome  $c_6$ -like protein as a putative donor of electrons to photosystem I in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. *Photosynthesis Research* **110**(1):61-72.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Hedman M & Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **11**:1-61.

Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ & Reeves HC (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical Biochemistry* **167**(2):290-294.

Rögner M, Nixon PJ & Diner BA (1990) Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry* **265**(11):6189-6196.

Roncel M, Boussac A, Zurita JL, Bottin H, Sugiura M, Kirilovsky D & Ortega JM (2003) Redox properties of the photosystem II cytochromes  $b_{559}$  and  $c_{550}$  in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **8**(1-2):206-216.

Sandmann G (1985) Consequences of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae. *Photosynthesis Research* **6**(3):261-271.

Scherer S (1990) Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *Trends in Biochemical Sciences* **15**(12):458-462.

Schmetterer G (1994) Cyanobacterial respiration. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, ed Bryant DA (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), pp 409-435.

Schmetterer G, Valladares A, Pils D, Steinbach S, Pacher M, Muro-Pastor AM, Flores E & Herrero A (2001) The *coxBAC* operon encodes a cytochrome *c* oxidase required for heterotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* strain ATCC 29413. *Journal of Bacteriology* **183**(21):6429-6434.

Serrano A, Giménez P, Scherer S & Böger P (1990) Cellular localization of cytochrome  $c_{553}$  in the  $N_2$ -fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Archives of Microbiology* **154**:614-618.

Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, Tandeau de Marsac N, Rippka R, Herdman M, Sivonen K, Coursin T, Laurent T, Goodwin L, Nolan M, Davenport KW, Han CS, Rubin EM, Eisen JA, Woyke T, Gugger M & Kerfeld CA (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(3):1053-1058.

Sigfridsson K, Young S & Hansson Ö (1996) Structural dynamics in the plastocyanin-photosystem 1 electron-transfer complex as revealed by mutant studies. *Biochemistry* **35**(4):1249-1257.

Smith AJ (1982) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *The Biology of Cyanobacteria*, eds Carr NG & Whitton BA (Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK), pp 47-85.

Stanier RY & Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic Prokaryotes: the Cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* **31**:225-274.

Stewart WD (1980) Some aspects of structure and function in  $N_2$ -fixing cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology* **34**:497-536.

Studier FW & Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**(1):113-130.

Swiezewska E (2004) Ubiquinone and plastoquinone metabolism in plants. *Methods in Enzymology* **378**:124-131.

Sykes AG (1985) Structure and electron-transfer reactivity of the blue copper protein plastocyanin. *Chemical Society Reviews* **14**:283-315.

Takabe T, Takenaka K, Kawamura H & Beppu Y (1986) Charges on proteins and distances of electron transfer in metalloprotein redox reactions. *Journal of Biochemistry* **99**(3):833-840.

Tandeau De Marsac N & Houmard J (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* **104**:119-190.

Thöny-Meyer L, Fischer F, Künzler P, Ritz D & Hennecke H (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *Journal of Bacteriology* **177**(15):4321-4326.

Torrado A, Valladares A, Puerto-Galán L, Hervás M, Navarro JA & Molina-Heredia FP (2016) Cytochrome  $c_{6-3}$ : A new isoform of photosynthetic cytochrome  $c_6$  exclusive of heterocyst-forming cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* doi: **10.1093/pcp/pcw184**

Ubbink M (2004) Complexes of photosynthetic redox proteins studied by NMR. *Photosynthesis Research* **81**(3):277-287.

Valladares A, Maldener I, Muro-Pastor AM, Flores E & Herrero A (2007) Heterocyst development and diazotrophic metabolism in terminal respiratory

oxidase mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **189**(12):4425-4430.

Valladares A, Rodríguez V, Camargo S, Martínez-Noel GM, Herrero A & Luque I (2011) Specific role of the cyanobacterial PipX factor in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology* **193**(5):1172-1182.

Van de Meene AM, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WF & Roberson RW (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology* **184**(5):259-270.

Van der Plas J, Bovy A, Kruyt F, de Vrieze G, Dassen E, Klein B & Weisbeek P (1989) The gene for the precursor of plastocyanin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7937: isolation, sequence and regulation. *Molecular Microbiology* **3**(3):275-284.

Wastl J, Bendall DS & Howe CJ (2002) Higher plants contain a modified cytochrome  $c_6$ . *Trends in plant science* **7**(6):244-245.

Wastl J, Purton S, Bendall DS & Howe CJ (2004) Two forms of cytochrome  $c_6$  in a single eukaryote. *Trends in Plant Science* **9**(10):474-476.

Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F & Leister D (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(33):31286-31289.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**(2):221-271.

Wolk CP (1982) Heterocysts. *The Biology of Cyanobacteria*, ed Carr BA (Blackwell Scientific Publications, Oxford, England), pp 359-386.

Wolk CP, Ernst A & Elhai J (1994) Heterocyst metabolism and development. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, ed Bryant DA (Springer, Netherlands), pp 769-823.

Wolk CP & Shaffer PW (1976) Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Archives of Microbiology* **110(23)**:145-147.

Worrall JA, Luisi BF, Schlarb-Ridley BG, Bendall DS & Howe CJ (2008) Cytochrome  $c_{6A}$ : discovery, structure and properties responsible for its low haem redox potential. *Biochemical Society Transactions* **36(Pt 6)**:1175-1179.

Worrall JA, Schlarb-Ridley BG, Reda T, Marcaida MJ, Moorlen RJ, Wastl J, Hirst J, Bendall DS, Luisi BF & Howe CJ (2007) Modulation of heme redox potential in the cytochrome  $c_6$  family. *Journal of the American Chemical Society* **129(30)**:9468-9475.

Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33(1)**:103-119.

Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G & Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **21(5)**:809-818.

Yu HF, Jia SR & Dai YJ (2009) Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Journal of Applied Phycology* **21**:127-133.

Zatwarnicki P, Barciszewski J, Krzywda S, Jaskolski M, Kolesinski P, & Szczepaniak A (2014) Cytochrome  $c_{6B}$  of *Synechococcus* sp. WH 8102--crystal structure and basic properties of novel  $c_6$ -like family representative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **443(4)**:1131-1135.

Zhang L, Pakrasi HB & Whitmarsh J (1994) Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the absence of cytochrome  $c_{553}$  and plastocyanin. *The Journal of Biological Chemistry* **269**(7):5036-5042.