

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Bioquímica y Biología molecular y celular

**Estudios funcionales de la proteína FurB en
Anabaena sp. PCC 7120**

Proyecto para optar al título de Máster en Biología molecular y
celular

Violeta Calvo Sein-Echaluce

Resumen

La proteína FurB pertenece a la familia Fur (ferric uptake regulator) de factores de transcripción, que regulan la homeostasis del hierro en *Anabaena* sp. PCC 7120 y otros microorganismos. En la cianobacteria coexisten tres parálogos de esta familia: FurA, que regula la homeostasis del hierro y es un regulador global de la transcripción; FurB, que modula también la homeostasis del zinc y se une de forma inespecífica al DNA para protegerlo del daño oxidativo y FurC, cuya transcripción se ve incrementada en condiciones de déficit de nitrógeno.

El objetivo principal de este proyecto es aportar nuevos datos para dilucidar los procesos biológicos en los que interviene FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120. Para ello, se ha realizado la caracterización fenotípica de un mutante de *Anabaena* sp. PCC 7120 con el gen *furB* deletado y se ha obtenido un mutante sobreexpresando la proteína FurB, para su caracterización en futuros trabajos. Se ha estudiado también el nivel de expresión de la proteína en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés y su capacidad de unión *in vitro* a algunos promotores de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos con el mutante de delección de FurB sugieren la implicación de la proteína en la regulación transcripcional de genes que intervienen en la determinación de la morfología celular y en fotosíntesis y también que, la ausencia de FurB como proteína protectora en este mutante, podría llevar a la inducción de enzimas antioxidantes como la catalasa. Los estudios realizados con el mutante de sobreexpresión de FurB revelan que una mayor expresión de la proteína está ligada a una disminución en la expresión de FurA. Esto sugiere que FurB podría ejercer un efecto compensatorio para ciertas funciones de FurA. Los estudios de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 muestran que su expresión aumenta bajo condiciones moderadas de estrés oxidativo causado por agua oxigenada pero disminuye en condiciones más extremas, seguramente debido a la destrucción de la proteína. Además, la expresión de la proteína aumenta en condiciones de iluminación alta y disminuye en condiciones de baja iluminación. En cambio, la expresión no se ve modificada bajo diferentes condiciones de disponibilidad de zinc, sugiriendo que una cantidad basal de proteína es suficiente para llevar a cabo su función reguladora. Por último, no se ha observado interacción de la proteína con los promotores de la Fe-SOD ni con el promotor de la glutatión reductasa de *Anabaena* y, por lo tanto, no existiría una regulación directa de dichos genes por parte de FurB.

Abreviaturas

Abreviaturas

| | |
|--------------|--|
| Abs | Absorbancia |
| Amp | Ampicilina |
| AMS | 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid |
| APS | Ammonium persulfate (persulfato de amonio) |
| bp / pb | Basepairs (pares de bases) |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BrEt | Bromuro de etidio |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| Chl α | Clorofila a |
| Cm | Cloramfenicol |
| Da | Dalton (g/mol) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAsa I | Desoxirribonucleasa I |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | 1,4-ditiotreitol |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| Fur | Ferric unptake regulator |
| FW | Fresh weight (peso fresco) |
| Km | Kanamicina |
| LB | Medio Luria Bertani |
| LBA | LB con agar |
| NBT | NitroBlue Tetrazolium (nitro-azul de tetrazolio) |
| Nm | Neomicina |
| O/N | Over Night (toda la noche) |
| PAGE | Poliacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida) |
| PCC | Pasteur Culture Collection (colección de cultivos del Instituto Pasteur) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PCV | Packed Cell Volume (volumen celular empaquetado) |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PSI | Fotosistema I |
| PSII | Fotosistema II |
| PVDF | Fluoruro de polivinilo |
| ROS | Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno) |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| RubisCO | Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato sódico) |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| St | Estreptomina |
| Sp | Espectinomicina |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina |
| TPEN | N,N,N',N'- <i>tetrakis</i> -(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine |
| TRIS | tris-hidroximetil-aminoetano |
| UV | Ultravioleta |
| WB | Western blot |

Aminoácidos

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

Indice de contenidos

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1. Las cianobacterias | 2 |
| 1.1.1. Origen y evolución | 2 |
| 1.1.2. Clasificación | 3 |
| 1.1.3. Características estructurales | 3 |
| 1.1.4. Diferenciación celular | 5 |
| 1.1.5. Fotosíntesis oxigénica | 6 |
| 1.1.6. Fijación del nitrógeno | 6 |
| 1.2. El hierro | 7 |
| 1.2.1. Importancia del hierro en los seres vivos | 7 |
| 1.2.2. Regulación del metabolismo del hierro por la familia Fur | 9 |
| 1.3. Proteínas Fur en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 | 11 |
| 1.3.1. FurA | 11 |
| 1.3.2. FurB | 12 |
| 1.3.3. FurC | 12 |
| 1.4. Estrés oxidativo en cianobacterias | 13 |
| 1.4.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) | 13 |
| 1.4.2. Eliminación de ROS | 14 |
| 2. Objetivos | 16 |
| 3. Materiales y métodos | 18 |
| 3.1. Condiciones de cultivo y cepas empleadas | 18 |
| 3.2. Técnicas de trabajo con ácidos nucleicos | 19 |
| 3.2.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> | 19 |
| 3.2.2. Extracción de DNA genómico de <i>Anabaena</i> sp. | 20 |
| 3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 20 |
| 3.2.4. Digestión enzimática doble y ligación | 21 |
| 3.3. Métodos genéticos | 21 |
| 3.3.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico | 21 |
| 3.3.2. Conjugación triparental en <i>Anabaena</i> sp. | 22 |
| 3.4. Métodos analíticos | 25 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.4.1. | Determinación de la velocidad de crecimiento y tasa de duplicación..... | 25 |
| 3.4.2. | Determinación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales..... | 25 |
| 3.4.3. | Determinación de especies reactivas de oxígeno | 27 |
| 3.4.4. | Determinación de la actividad catalasa..... | 28 |
| 3.4.5. | Determinación de la actividad superóxido dismutasa | 28 |
| 3.5. | Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria | 30 |
| 3.6. | Microscopía | 31 |
| 3.6.1. | Microscopía óptica y de fluorescencia | 31 |
| 3.6.2. | Microscopía electrónica | 31 |
| 3.7. | Técnicas de estudio de proteínas | 31 |
| 3.7.1. | Western blot..... | 31 |
| 3.7.2. | Ensayos de retardo en gel (EMSA) | 32 |
| 4. | Resultados..... | 35 |
| 4.1. | Caracterización fenotípica de <i>Anabaena ΔfurB</i>..... | 35 |
| 4.1.1. | Caracterización morfológica..... | 35 |
| 4.1.2. | Determinación de la velocidad de crecimiento y tasa de duplicación..... | 38 |
| 4.1.3. | Determinación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales..... | 40 |
| 4.1.4. | Determinación de especies reactivas de oxígeno | 41 |
| 4.1.5. | Determinación de la actividad catalasa..... | 42 |
| 4.1.6. | Determinación de la actividad superóxido dismutasa | 42 |
| 4.1.7. | Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria..... | 43 |
| 4.2. | Obtención de una estirpe de sobreexpresión de FurB en <i>Anabaena sp</i>..... | 44 |
| 4.2.1. | Clonaje de <i>furB</i> en el vector lanzadera pAM2770..... | 44 |
| 4.2.2. | Conjugación triparental en <i>Anabaena sp</i> | 45 |
| 4.2.3. | Selección del clon con mayor sobreexpresión de FurB..... | 46 |
| 4.3. | Expresión de FurB bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés en <i>Anabaena sp</i>. PCC 7120 | 48 |
| 4.3.1. | Expresión de FurB bajo estrés oxidativo | 48 |
| 4.3.2. | Expresión de FurB bajo diferentes condiciones de iluminación | 49 |
| 4.3.3. | Expresión de FurB en función de la cantidad de zinc del medio..... | 50 |
| 4.4. | Afinidad <i>in vitro</i> de FurB a distintos promotores | 50 |
| 5. | Discusión | 54 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.1. | Caracterización fenotípica de <i>Anabaena</i> $\Delta furB$ | 54 |
| 5.2. | Obtención de una estirpe de sobreexpresión de FurB en <i>Anabaena</i> sp..... | 57 |
| 5.3. | Expresión de FurB bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 | 57 |
| 6. | Conclusiones | 60 |
| 7. | Bibliografía | 63 |

1. Introducción

1. Introducción

1.1. Las cianobacterias

1.1.1. Origen y evolución

Las cianobacterias tienen una larga historia evolutiva y la mayoría de los expertos están de acuerdo en que se originaron hace unos 3500 millones de años, en la Era Proterozoica o Era de las cianobacterias. Esta Era coincide con un aumento en la cantidad de oxígeno atmosférico hasta llegar a, aproximadamente, una cuarta parte del que hay en la actualidad. En Eras posteriores fueron las algas y las plantas terrestres las que aumentaron la cantidad de oxígeno hasta los niveles actuales (Xiong *et. al.*, 2003).

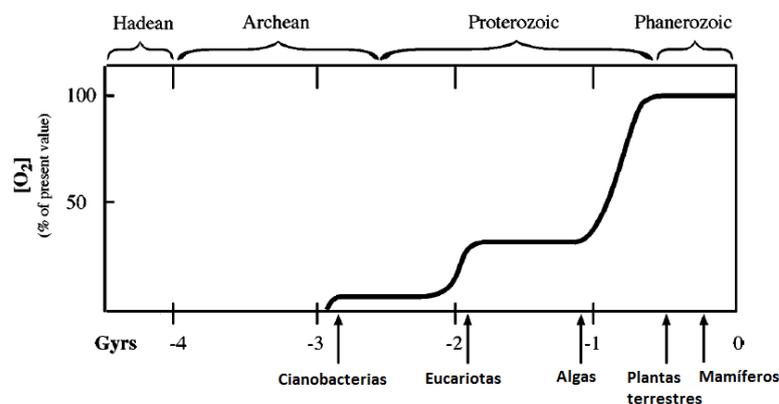


Figura 1. Porcentaje de oxígeno (respecto al actual) en la atmósfera primitiva. Se observa el aumento inicial en la cantidad de oxígeno atmosférico debido a la aparición de las cianobacterias y el aumento posterior debido a las algas y plantas terrestres. 1 Gyr (giga-year) = $1 \cdot 10^9$ años. Adaptado de Xiong *et al.*, 2003.

Así, las cianobacterias han tenido un papel esencial en el desarrollo de la vida hasta nuestros días porque contribuyeron a la transformación de la atmósfera primitiva: llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica y, al emplear el agua como donador de electrones, provocaron la liberación de grandes cantidades de oxígeno. De esta manera, la atmósfera pasó de ser anaeróbica y reductora a rica en oxígeno. Esto provocó una fuerte presión evolutiva en el resto de los organismos, todos ellos anaerobios estrictos, dando lugar al desarrollo de mecanismos de resistencia al oxígeno y a la aparición de cadenas de transporte electrónico con el oxígeno como aceptor final. Además, permitió la aparición de la capa de ozono que protege a la Tierra de la radiación ultravioleta (Xiong *et. al.*, 2002). Las cianobacterias también son muy importantes por su papel en los ciclos del carbono y del nitrógeno y por su contribución a la producción primaria de los océanos fijando el nitrógeno atmosférico, aunque constituyen tan solo el 1% de la biomasa marina.

1.1.2. Clasificación

Las cianobacterias constituyen uno de los subgrupos más grandes de procariotas Gram negativos y se clasifican dentro del grupo de las eubacterias. Tradicionalmente y de acuerdo a criterios morfológicos y en función de su división celular, se clasifican en 5 grupos (Rippka *et. al.*, 1978):

- Sección I: cianobacterias unicelulares que se reproducen por fisión binaria (la mayoría) o por gemación (*Chamaesiphon*). Las células son cilíndricas, esféricas u ovals.
- Sección II: cianobacterias unicelulares que se reproducen por fisión múltiple, dando lugar a células hijas llamadas baeocitos. La fisión múltiple es simplemente una fisión binaria muy rápida, en la cual la célula vegetativa parental se divide sucesivas veces dando lugar a 4-1000 baeocitos, que tienen forma esférica.
- Sección III: cianobacterias filamentosas que no forman heterocistos (células diferenciadas) y cuyas células vegetativas se dividen en un solo plano.
- Sección IV: cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en un solo plano.
- Sección V: cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en más de un plano.

En la actualidad, las cianobacterias también se han clasificado en función de la secuencia de su 16S rRNA, que está muy conservado a lo largo de la evolución, de forma que las diferencias en su secuencia dan idea de la distancia evolutiva entre dos especies, y también en función de genes metabólicos como *rbcL* y *hetR*, que permiten dilucidar las relaciones filogenéticas entre las distintas especies (Tomitani *et al.*, 2006).

1.1.3. Características estructurales

Las cianobacterias poseen una pared celular que determina la forma, tamaño y organización de la célula y también controla la exportación e importación de sustancias. La estructura y composición de esta pared celular es similar a las de los microorganismos Gram negativos (Carr *et al.*, 1982):

- Capa de peptidoglicanos: se encuentra envolviendo a la membrana plasmática y es más gruesa que en la mayoría de las bacterias Gram negativas. El grosor es de 1-10 nm, pero puede llegar hasta los 200 nm en especies como *Oscillatoria princeps*. Es resistente al tratamiento con SDS al 1% a 100°C pero, en cambio, puede ser eliminada total o parcialmente mediante tratamiento con lisozima.
- Membrana externa: contiene lipopolisacáridos y proteínas en la cara externa, y lipoproteínas, fosfolípidos y proteínas en su cara interna (van de Meene *et al.*, 2006).

- Cubierta externa S: se cree que protege a la célula frente a condiciones ambientales adversas y contribuye a la formación de organismos multicelulares.

Además, las cianobacterias tienen una gran cantidad de inclusiones intracelulares:

- Gránulos de cianoficina: polímeros de alto peso molecular formados por cantidades equimoleculares de Arg y Asp y que constituyen reservorios de N.
- Carboxisomas: cuerpos poliédricos formados por anhidrasa carbónica y RUBISCO, que es una de las enzimas principales del ciclo de Calvin.
- Gránulos de poliglucosa y poli- β -hidroxibutirato: reserva de carbono y energía.
- Gránulos de glucógeno: reserva de carbohidratos
- Gránulos de polifosfato: reserva de fosfato
- Gránulos lipídicos: reserva de lípidos
- Vesículas gaseosas: regulan la flotabilidad de la cianobacteria en medio acuoso y, de esta manera, la disponibilidad de nutrientes y la iluminación a la que se ve expuesta.
- Ficobilisomas: son estructuras ordenadas formadas por ficobiliproteínas, necesarias para la captación de la energía lumínica por parte de las cianobacterias

En la región nuclear (carente de envoltura) se localiza el genoma de las cianobacterias, que es DNA bicatenario circular. Su tamaño oscila entre los 2-13 Mb según la especie y el número de copias de este cromosoma también varía entre especies (Herdman *et al.*, 1979). En el año 2001 se secuenció el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, que consta de un cromosoma de unos 6400 pb y 6 plásmidos denominados α , β , γ , δ , ϵ y ζ y que tienen un tamaño de entre 5 y 408 pb (Kaneko *et al.*, 2001).

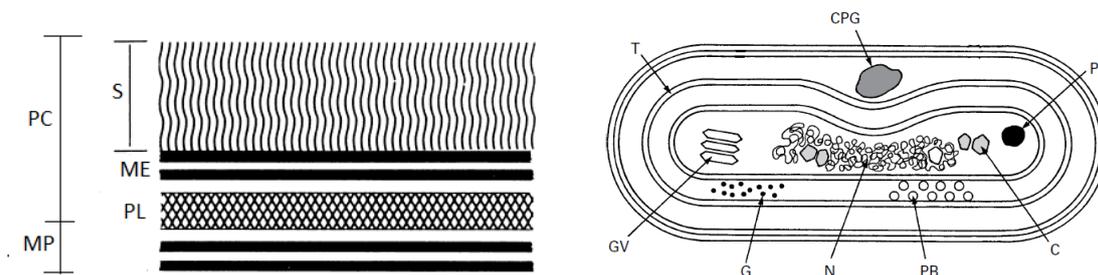


Figura 2. Esquema de la pared celular (izquierda) y del contenido de una cianobacteria (derecha). En la imagen izquierda: MP representa a membrana plasmática y PC a la pared celular, compuesta a su vez por: capa de peptidoglicanos (PL), membrana externa (ME) y cubierta externa (S). Adaptado de Carr *et al.*, 1982. En la imagen derecha: carboxisoma (C), gránulo de polifosfato (P), gránulo de cianoficina (CPG), membrana tilacoidal (T), vesícula gaseosa (VG), región nuclear (N), ficobilisomas (PB). Adaptado de Adams and Duggan, 1999.

1.1.4. Diferenciación celular

Las cianobacterias pueden presentar 3 tipos distintos de células especializadas, que se desarrollan a partir del tipo celular básico o célula vegetativa:

1.1.4.1. Hormogonios

Son cortos filamentos de células indiferenciadas característicos de las cianobacterias filamentosas. Se distinguen de las células vegetativas en que los filamentos que forman son móviles y, por lo tanto, se cree que pueden intervenir en la dispersión de la cianobacteria en medios terrestres. También podrían intervenir en el establecimiento de relaciones simbióticas con otros organismos, principalmente con eucariotas (plantas, hongos, etc). De hecho, se ha observado que la producción de hormogonios en cianobacterias del género *Nostoc* aumenta en presencia de *Anthoceros punctatus*, que es una planta con la cual establecen simbiosis este género de cianobacterias (Campbell *et al.*, 1989).

1.1.4.2. Acinetos

Son células más grandes y con pared celular más gruesa que las células vegetativas. La conversión de una célula vegetativa en acineto implica: aumento en el tamaño de la célula (de 10 μm a 50-80 μm), desaparición de las vesículas de gas, estrechamiento de los espacios intratilacoidales, proliferación de los gránulos de glucógeno y disminución del tamaño y número de los gránulos lipídicos. Estas características las convierten en células resistentes a condiciones adversas, aunque no tanto como las endosporas bacterianas. Por lo tanto, surgen en condiciones desfavorables para la supervivencia (exposición al frío, desecación, limitación de fosfatos, etc.). Una vez que las condiciones del medio son adecuadas, los acinetos dan lugar a las células vegetativas mediante un proceso denominado germinación (Carr *et al.*, 1982).

1.1.4.3. Heterocistos

Son células diferenciadas que se intercalan entre las células vegetativas y que están especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (Carr *et al.*, 1982). Esta fijación está favorecida por las características de los heterocistos: tienen una gruesa envuelta, que impide de forma casi total la entrada de oxígeno para favorecer la actividad de la enzima nitrogenasa; expresan superóxido dismutasa, para eliminar ROS que pudieran dañar el complejo nitrogenasa y, por último, tienen una alta actividad del PSI y carencia de PSII, para evitar la liberación de oxígeno en el interior de estas estructuras.

Por el contrario, los heterocistos no fijan nada de CO_2 porque carecen de la enzima RubisCO necesaria para ello. El desarrollo de nuevos heterocistos comienza cuando se agotan las reservas de nitrógeno fijado o cuando la distancia entre dos heterocistos preexistentes aumenta. El amonio detiene la formación de heterocistos y provoca la reversión de los ya existentes hacia células vegetativas. La misma inhibición ocurre en *Anabaena* sp. por parte del nitrato. Además, estas células no se dividen.

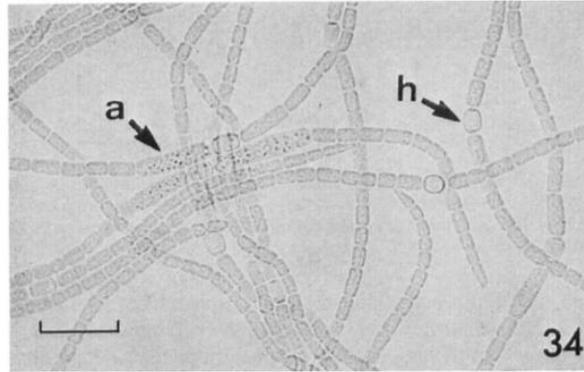


Figura 3. Acinetos (a) y heterocistos (h) en *Anabena* sp. PCC 7120. La barra representa 20 μm . Fotografía tomada de Rippka *et al.*, 1978.

1.1.5. Fotosíntesis oxigénica

Las cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica mediante un aparato fotosintético muy similar al de los cloroplastos de algas y plantas superiores. No obstante, existen algunas diferencias con respecto al aparato fotosintético de éstos:

- En cianobacterias, las membranas fotosintéticas (tilacoidales) se encuentran distribuidas en el citoplasma, mientras que en eucariotas esas membranas se apilan formando los denominados grana.
- Los principales pigmentos fotosintéticos en las cianobacterias son las ficobiliproteínas, que están organizadas en ficobilisomas en la superficie de la membrana tilacoidal. Las ficobiliproteínas tienen unidas covalentemente a las ficobilinas, que son tetrapirroles de cadena abierta que captan luz de 520-630 nm.

Por lo tanto, las cianobacterias son capaces de fijar el CO_2 atmosférico en forma de azúcares (ciclo de Calvin), obteniendo el poder reductor necesario, en forma de NADPH, de la cadena de transporte electrónico (fase luminosa).

1.1.6. Fijación del nitrógeno

Muchas cianobacterias son también capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio (fijación del nitrógeno) para luego incorporarlo a las moléculas orgánicas. Aunque el nitrógeno es el gas más abundante en la atmósfera terrestre es muy poco reactivo, y de ahí que tenga que ser previamente reducido a amonio para luego ser incorporado en distintas moléculas. El proceso está catalizado por el complejo multimérico nitrogenasa. Este complejo está muy conservado y se encuentra en multitud de procariontes pero en ningún eucariota (Berman-Frank *et al.*, 2003). Está constituido por:

- Proteína MoFe (200.000 - 270.000 Da): es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$. Cada una de las subunidades tiene un clúster P (centro Fe_8S_7 que funciona como canal

para la transferencia de electrones, aceptando los electrones que le transfiere el clúster Fe_4S_4 de la proteína Fe) y un centro $\text{Fe}_7\text{Mo}_1\text{S}_9$ (acepta los electrones del clúster P). Este último centro es el que une el N_2 y otros sustratos (N_3^- , N_2O , HCN , CH_3NC , CH_3CN , entre otros) y cataliza su reducción.

- Proteína Fe (60.000 Da): contiene un clúster Fe_4S_4 , localizado entre dos subunidades idénticas de aproximadamente 32-40 kDa. Proporciona los equivalentes de reducción/electrones a la otra proteína, empleando para ello la energía derivada de la hidrólisis del ATP.

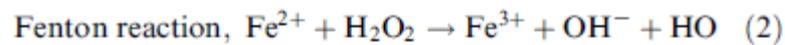
Todos los complejos nitrogenasa estudiados hasta la actualidad han resultado ser inhibidos irreversiblemente por el oxígeno y por las ROS. El oxígeno altera la estructura del complejo y también, en algunas especies, inhibe su síntesis. Por lo tanto, las cianobacterias en las que coexisten la fotosíntesis oxigénica y la fijación del nitrógeno han desarrollado estrategias para el funcionamiento de ambos procesos a la vez (Berman-Frank *et al.*, 2003): separación en el tiempo (la fijación del N_2 se lleva a cabo por la noche, mientras no hay fotosíntesis) ó separación en el espacio (la fijación del N_2 se realiza en los heterocistos, que proporcionan al complejo nitrogenasa el ambiente anaerobio necesario para su funcionamiento).

1.2. El hierro

1.2.1. Importancia del hierro en los seres vivos

El hierro es un metal de transición muy abundante en la corteza terrestre, de hecho, es el cuarto elemento en abundancia. Hace unos 3 billones de años con la aparición de la fotosíntesis oxigénica, pasó de estado ferroso, relativamente soluble (0,1 M a pH7), a estado férrico, que es muy insoluble (10^{-18} a pH7). Además, el ión férrico reacciona rápidamente con oxígeno para dar lugar a óxidos insolubles e hidróxidos. Esto redujo drásticamente la biodisponibilidad de hierro, es decir, la capacidad de los seres vivos para incorporar y metabolizar este metal.

El hierro es absolutamente esencial para la vida, ya que participa en gran cantidad de procesos biológicos importantes: fotosíntesis, fijación del N_2 , metanogénesis, ciclo del ácido tricarbónico, transporte de oxígeno, regulación génica y síntesis del DNA. Lo hace fundamentalmente formando parte de proteínas, como especie mono- o binuclear o dentro de estructuras más complejas como clústers sulfoférricos o grupos hemo, lo cual le permite adquirir el potencial redox (-300 a +700 mV), geometría y estado de spin requeridos para llevar a cabo su función biológica. Sin embargo, es potencialmente tóxico bajo condiciones aeróbicas porque interviene en la denominada reacción de Fenton, resultando nocivo para los seres vivos.



Haber – Weiss reaction, (1) + (2) :

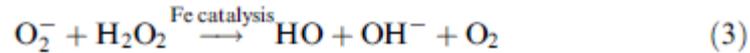


Figura 4. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss. El Fe^{3+} es reducido por los aniones superóxido del interior celular y, una vez en forma de Fe^{2+} , cataliza la descomposición del agua oxigenada, dando lugar al radical hidroxilo. Tomado de Andrews *et al.*, 2003.

Por lo tanto, en presencia de oxígeno, el hierro está poco biodisponible y es potencialmente tóxico. Esto hace necesario que los microorganismos deban mantener la homeostasis del hierro para disponer de la cantidad suficiente para cubrir todas sus funciones pero sin que llegue a resultar tóxico. Esto es especialmente importante en microorganismos como las cianobacterias que, debido a su metabolismo fotosintético, tienen un requerimiento de hierro 10 veces superior al de los microorganismos heterótrofos. Las principales estrategias adoptadas por los microorganismos para enfrentarse al estrés férrico son las siguientes:

- Producción de sideróforos: son moléculas de bajo peso molecular (<1000 Da) que tienen una gran afinidad y especificidad por el ión férrico ($K_{\text{aff}} > 10^{30}$) y que se secretan al exterior celular para captar el metal. Suelen ser sintetizados ante la carencia de hierro, aunque algunos permanecen siempre asociados con la envuelta celular, como las micobactinas de las micobacterias. Se han caracterizado alrededor de 500 diferentes y se clasifican dependiendo del grupo que emplean como ligando del metal.
- Depósitos intracelulares de hierro: el metal es acumulado mediante proteínas de almacenamiento. Presentan las ventajas de que la bacteria puede disponer de hierro aunque éste sea escaso en el entorno y, además, se previene el daño celular porque el hierro está “aislado”. El hierro es captado por estas proteínas en la forma ferrosa soluble, pero se almacena en el interior en forma férrica. Para ello, el hierro es oxidado por el oxígeno (o por agua oxigenada) en un proceso catalizado por residuos de la propia proteína, concretamente, por residuos localizados en cada uno de los monómeros que componen la proteína y que permiten la unión de dos iones ferrosos. Existen tres tipos de proteínas de almacenamiento en las bacterias, los cuales pueden coexistir en un mismo microorganismo:
 - Ferritinas: se encuentran en procariotas y también en eucariotas. Constan de 24 subunidades iguales o muy similares entre ellas, que se ensamblan formando una esfera en cuyo interior se almacena el metal. Cada subunidad contiene un fardo de 4 hélices alfa. Como son relativamente grandes (aprox. 500 kDa) pueden acumular 2000-3000 átomos de hierro.
 - Bacterioferritinas: sólo están en eubacterias. Su estructura es muy similar a la de las ferritinas y almacenan una cantidad de hierro semejante. La

principal diferencia es que contienen hemo como grupo prostético. Se desconoce con exactitud la función de ese grupo hemo, pero se cree que puede intervenir en la liberación del hierro contenido en la proteína, ya que las bacterioferritinas mutantes carentes de este hemo almacenan más átomos de hierro que las bacterioferritinas que sí que lo tienen.

- Dps: sólo se encuentran en procariotas. También se conocen con el nombre de mini-ferritinas porque constan de sólo 12 subunidades, por lo que son más pequeñas que las anteriores (aproximadamente 250 kDa) y acumulan menos hierro (500 átomos). Suelen emplear H_2O_2 , en lugar de oxígeno, como oxidante del Fe^{2+} . La primera proteína Dps se descubrió en *E. coli*, en donde se vió que se unía de forma inespecífica al DNA. Esto parece indicar que la función de esta proteína es la de proteger al DNA de la acción combinada del ión ferroso y el agua oxigenada, que dan lugar al radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton antes mencionada.
- En situaciones de carencia de hierro, disminución en la expresión de proteínas cuya síntesis requiere de este metal. Ejemplo: en *E. coli* la enzima superóxido dismutasa tiene dos isómeros, Mn-SOD (se expresa cuando los niveles de hierro son bajos) y Fe-SOD (se expresa cuando los niveles de hierro son altos) y, en algunas especies de cianobacterias como *Anabaena* sp. PCC 7120, se sustituye la ferredoxina por flavodoxina.
- Empleo de sistemas de resistencia frente al estrés oxidativo: en algunas especies como *Anabaena* sp. PCC 7120, la carencia de hierro conduce a un aumento en la cantidad de ROS (Latifi *et al.*, 2005). Esto hace necesario el funcionamiento de enzimas de degradación de estas especies (peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa) y de reparación del daño oxidativo.

En definitiva, todos estos mecanismos son el resultado de la estricta regulación a nivel génico de la adquisición, almacenamiento y consumo de hierro en los seres vivos en función de los niveles de éste.

1.2.2. Regulación del metabolismo del hierro por la familia Fur

La familia Fur es una de las familias más importantes de metalorreguladores en bacterias (Ma *et al.*, 2009). Las proteínas metalorreguladoras actúan de forma conjunta para mantener la homeostasis de los diferentes metales en el interior de la célula; funcionando como reguladores transcripcionales de genes que intervienen en el transporte y metabolismo de los mismos.

En microorganismos heterótrofos, las proteínas Fur tienen dos sitios de unión a metal, uno con carácter estructural, que es necesario para mantener la conformación adecuada y suele contener zinc en la mayoría de los casos, y un sitio regulador, en el que se localiza el metal cuya homeostasis está regulada por la proteína o un metal que cataliza una reacción necesaria para la detección de la especie regulada por la

proteína. En función del metal regulador que posean, las proteínas Fur se engloban dentro de distintas subfamilias y tienen diferentes funciones (Lee and Helmann, 2007): Fur (contienen hierro como metal regulador y, por lo tanto, regulan principalmente la homeostasis de este metal), Zur (contienen zinc como metal regulador), Mur (contienen manganeso), Nur (contienen níquel), PerR (contienen hierro como metal regulador y lo emplean para catalizar reacciones de oxidación y detectar así el estrés oxidativo) e Irr (contiene hierro hemínico como cofactor y, por lo tanto, interviene en la detección de los niveles de hemo intracelular). Pero, de ahora en adelante, cuando hablemos de proteínas Fur, nos referiremos exclusivamente a aquellas que contienen hierro como metal regulador y que regulan su homeostasis.

De forma general, las proteínas Fur se caracterizan por tener un bajo peso molecular (entre 13 y 20 kDa), bajo contenido en triptófano, poseer el motivo rico en histidinas HHXHXXCXC y unirse al DNA en forma de dímero, siendo el dominio N-terminal el de unión al DNA y el C-terminal el implicado en la dimerización.

En cuanto a su función reguladora de la transcripción, Fur actúa como represor: reprime la transcripción de los genes de adquisición de hierro mediante interacción con el co-represor (Fe^{2+}) en situaciones de alta concentración de éste. La represión se lleva a cabo gracias a la unión del dímero al DNA en los promotores de los genes a silenciar, de tal manera que se impide el acceso de la RNA polimerasa. Por el contrario, en condiciones de baja concentración de hierro, la proteína se encuentra en su forma apo (sin Fe^{2+}) y se separa del DNA, permitiendo la transcripción de los genes de adquisición de hierro.

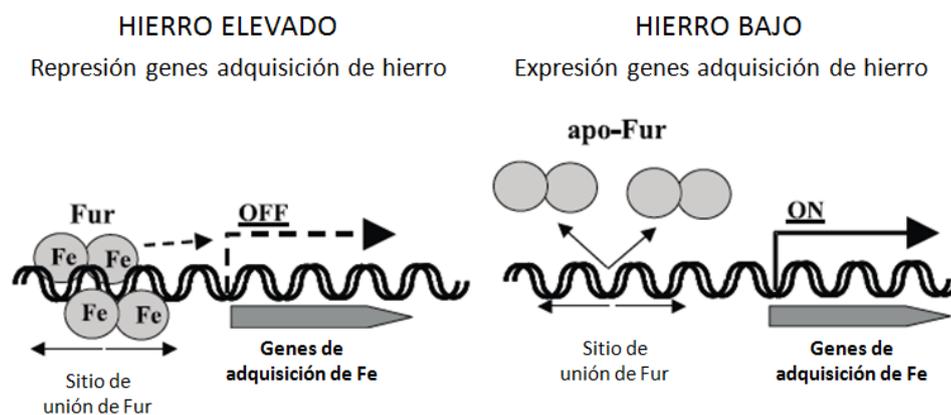


Figura 5. Regulación transcripcional directa por medio de Fur. A alta concentración de hierro, Fur se une al promotor e impide la transcripción de los genes de adquisición de hierro. A baja concentración de hierro, Fur se separa del promotor y permite la transcripción de los genes. Adaptado de Andrews *et al.*, 2003.

El complejo Fur- Fe^{2+} se une normalmente entre los sitios -10 y -35 de los promotores de los genes a regular. Los sitios de unión contienen una secuencia consenso llamada *iron box* o *Fur box* (*caja Fur*), que consta de 19 pb y es palindrómica:



No obstante, Fur también actúa como activador de algunos genes, principalmente de almacenamiento y empleo de hierro. En *E. coli*, algunos de los genes activados por Fur son los de la superóxido dismutasa (*sodB*), aconitasa A (*acnA*), fumarasa A (*fumA*), succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*), bacterioferritina (*bfr*) y ferritina (*ftnA*). Pero dichos genes no contienen la secuencia consenso de la *iron box* y, por lo tanto, la activación por Fur se llevaría a cabo de forma indirecta: cuando los niveles de hierro son bajos, la proteína Fur no se une al DNA y no se reprime la síntesis del RNA antisentido pequeño, RyhB. Este sRNA impide la traducción de los mensajeros de los genes antes mencionados. Por el contrario, cuando los niveles de hierro son elevados, la proteína Fur se une al DNA e impide la transcripción de RyhB. Así, RyhB no puede unirse a los mensajeros diana y se sintetizan las proteínas anteriores (Masse and Gottesman, 2002). Experimentos más recientes sugieren que Fur podría actuar como activador transcripcional de forma directa en algunos genes, pero el mecanismo por el cual sucedería todavía no está claro.

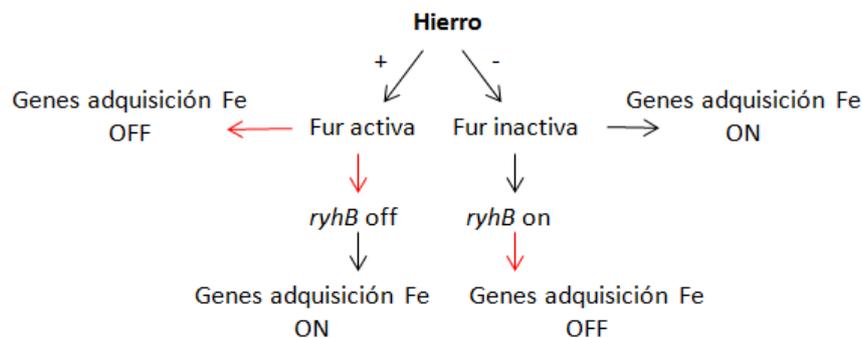


Figura 6. Regulación transcripcional indirecta mediada por Fur. Las flechas en rojo simbolizan represión. Adaptado de Masse and Gottesman, 2002.

1.3. Proteínas Fur en *Anabaena* sp. PCC 7120

El análisis genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 en busca del motivo rico en histidinas permitió encontrar tres proteínas Fur distintas en esta especie, que se denominaron: FurA (*all169*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*) (Hernández *et al.*, 2004). A continuación se describen algunas de las características de estas proteínas, que son objeto de estudio en nuestro laboratorio:

1.3.1. FurA

Es la que presenta una mayor homología (40-45%) con las proteínas Fur de bacterias heterótrofas. Concretamente, es idéntica a la proteína Fur identificada en *Anabaena* sp. PCC 7119, la cual tiene una gran similitud genética con *Anabaena* sp. PCC 7120.

Además, FurA es el miembro de la familia Fur más abundante en cianobacterias bajo condiciones estándar de cultivo y parece ser esencial para ellas, pues todos los

intentos de inactivar su gen, llevados a cabo en distintos laboratorios, han sido en vano y resultaban en estirpes no viables. Además de intervenir en la captación de hierro y en su almacenamiento, participa en la regulación de numerosas vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y la homeostasis redox (López-Gomollón *et al.*, 2007; González *et al.*). Bajo condiciones reductoras y de suficiencia del metal co-represor, la proteína FurA se une a los promotores de los genes de la propia FurA, FurB y FurC y también a los promotores de los genes que regula.

Por último, cabe destacar también que FurA es capaz de unirse al grupo hemo porque posee el motivo de unión Cys-Pro. Esa interacción disminuye la capacidad de FurA para unirse al DNA, por lo que se ha propuesto que el grupo hemo actuaría como un regulador de la proteína (Hernández *et al.*, 2004).

1.3.2. FurB

Al igual que FurA, FurB es capaz de unirse a todos los promotores (P_{furA} , P_{furB} , P_{furC}), pero lo hace más fuertemente en ausencia del metal co-represor. En ausencia de estrés oxidativo, la transcripción de esta proteína es baja y se une preferentemente a P_{furA} y P_{furC} . Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo, su nivel de transcripción aumenta y se une al DNA de forma inespecífica y lo protege del daño provocado por radicales hidroxilo y DNAsa I. Por lo tanto, se asume que FurB actúa como regulador génico o como protector del DNA dependiendo de su nivel de expresión (Lopez-Gomollón *et al.*, 2009).

Además, se ha descubierto recientemente que FurB modula la homeostasis del zinc en *Anabaena sp.*, actuando como una proteína Zur. FurB/Zur se une a los promotores de los genes que regula de forma dependiente de zinc, disminuyendo su afinidad por el DNA en presencia de un quelante del metal (Napolitano *et al.*, 2012).

Al igual que FurA, FurB también es capaz de unirse al grupo hemo porque posee el motivo Cys-Pro-Val. Además, la unión de hemo inhibe completamente la unión de la proteína al DNA, concretamente, a P_{furA} . Se cree que tanto este motivo CPV como el motivo CP de FurA, son motivos reguladores que sirven para la unión no covalente de proteínas al grupo hemo.

Como sucede con FurA, la sobreexpresión de FurB en *E. coli* produce un aumento de la resistencia de esta bacteria al estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009). Esto sugiere que, al inducirse fuertemente estos genes en presencia de peróxidos o de metil viológeno, se activa la transcripción de genes de defensa frente al estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa, etc).

1.3.3. FurC

A diferencia de las anteriores, FurC no se une a ninguno de los promotores *fur*. Estudios de retardo en gel sugieren que FurC podría modular la actividad de FurA y FurB, aumentando la habilidad de FurA de unirse al DNA y disminuyendo la de FurB (Hernández *et al.*, 2004). No obstante, deberían realizarse más estudios a este respecto para poder determinar si es el comportamiento real *in vivo*.

Al contrario que FurA y FurB, FurC no es capaz de unir hemo, lo cual podría deberse a la ausencia del motivo Cys-Pro-Val en su secuencia. Y también, a diferencia de lo que sucedía con FurA y con FurB, la sobreexpresión de FurC en *E. coli* no aumenta la resistencia de la bacteria bajo condiciones de estrés oxidativo. No obstante, FurC podría estar involucrada en la regulación de procesos metabólicos presentes en cianobacterias pero no en *E. coli*, como por ejemplo todos los relacionados con la fotosíntesis. De hecho, la expresión de FurC aumenta enormemente cuando se añade metil viológeno al medio de cultivo, que es un generador de aniones superóxido como los que se producen en la célula cuando el oxígeno molecular oxida el PSI.

Tabla 1. Características generales de las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC 7120.

| | Aminoácidos | Peso molecular (Da) | ϵ_{276} ($M^{-1}cm^{-1}$) | pI | nº Cys | Motivos CXXC | nº His | Motivos ricos en His | Unión de hemo |
|-------------|-------------|---------------------|--------------------------------------|------|--------|--------------|--------|---|---------------|
| FurA | 149 | 17144 | 13760 | 6'8 | 5 | 2 | 12 | H ₅ X ₂ CX ₂ C | + |
| FurB | 132 | 15116 | 5720 | 8'67 | 5 | 2 | 7 | H ₂ X ₂ CX ₂ C | + |
| FurC | 149 | 17328 | 13490 | 5'34 | 3 | 0 | 6 | HXXH ₂ CX ₂ T | - |

1.4. Estrés oxidativo en cianobacterias

1.4.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La fotosíntesis oxigénica llevada a cabo por las cianobacterias da lugar a la formación de oxígeno molecular. Esta especie por sí misma no es capaz de oxidar el DNA ni los aminoácidos, pero sí que puede transformarse en especies potencialmente dañinas, las especies reactivas de oxígeno, por medio de la adquisición de electrones. Algunas de las especies reactivas de oxígeno más importantes son:

- *Ión superóxido (O_2^-)*

Se produce por la reducción del oxígeno molecular. En organismos fotosintéticos se genera principalmente en el PSI: cuando los niveles de NADP⁺ no son muy altos, el O₂ acepta el electrón que le correspondería al NADP⁺, generándose el ión. La principal diana del ión superóxido son los centros sulfoferricos presentes en muchas enzimas, de tal manera que se libera un Fe²⁺ del centro y la enzima queda inactiva (Latifi *et al.*, 2009).

- *Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)*

Se produce por dismutación (espontánea o inducida por la SOD) del ión superóxido o, en organismos fotosintéticos, por una oxidación incompleta del agua en el PSII. Esta especie actúa sobre las proteínas, oxidando las metioninas o los grupos tiol de las cisteínas, y también sobre los centros sulfoferricos.

- *Radical hidroxilo (OH·)*

Se forma por radiólisis del agua o por la ya mencionada reacción de Fenton. Es la ROS que más biomoléculas puede dañar, siendo una de sus dianas preferidas el DNA.

1.4.2. Eliminación de ROS

Existen diferentes componentes celulares encargados de eliminar las ROS para minimizar los daños que puedan provocar, entre ellos se encuentran:

- *Superóxido dismutasa (SOD)*

Esta enzima cataliza la dismutación de dos moléculas superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno. Requiere de un cofactor metálico para llevar a cabo su acción y existen cuatro tipos de SOD en función del metal que emplean como cofactor: Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD y Ni-SOD. En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han identificado dos superóxido dismutasas, una dependiente de manganeso (sodA o Mn-SOD) y otra dependiente de hierro (sodB o Fe-SOD).

- *Catalasa*

Es la enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno o agua oxigenada en H₂O y O₂. Se ha identificado en todas las cianobacterias estudiadas hasta el momento.

- *Peroxidasa*

Reduce peróxido de hidrógeno a hidroperóxidos orgánicos gracias a los electrones suministrados por reductores como el ascorbato y el glutatión. Suelen tener mayor afinidad por el H₂O₂ y menor k_{cat} que las catalasas.

2. Objetivos

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es aportar nuevos datos para dilucidar los procesos biológicos en los que interviene la proteína FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar fenotípicamente el mutante de delección del gen *furB*, *Anabaena* $\Delta furB$, estudiando aspectos como su velocidad de crecimiento, morfología y actividad de enzimas antioxidantes
2. Generar una estirpe de sobreexpresión de FurB en *Anabaena* sp., tomando como estirpe parental la cepa PCC 7120, para su caracterización en trabajos posteriores
3. Analizar la expresión de FurB en cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés
4. Estudiar la afinidad *in vitro* de FurB a distintos promotores de genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Condiciones de cultivo y cepas empleadas

Las cepas de *E. coli* empleadas en este proyecto se describen en la tabla 3. Todas ellas se crecieron a 37°C en medio líquido Luria Bertani (10 g/l triptona; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l cloruro sódico) con agitación mecánica constante de 180 rpm. Para realizar el medio sólido, se adicionó agar hasta una concentración final del 1'5%. Cuando fue necesario, se añadió al medio la cantidad adecuada de antibiótico hasta las concentraciones indicadas en la tabla 4.

Las cepas de *Anabaena* sp. empleadas en este proyecto se describen en la tabla 3. Todas ellas se crecieron a 28°C en medio líquido BG-11 (ver composición en la tabla 2) y bajo iluminación de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bien con agitación mecánica de 180 rpm en un incubador orbital o con burbujeo constante de aire. El medio BG-11 se preparó añadiendo a 1L de medio basal, la cantidad adecuada de suplemento (1ml) y autoclavando la disolución resultante. Para realizar el medio sólido, se adicionó agar noble (Difco) hasta una concentración final del 1%. Cuando fue necesario, se añadió al medio la cantidad adecuada de antibiótico hasta las concentraciones indicadas en la tabla 4.

Con el fin de estudiar el nivel de expresión de FurB, se realizaron cultivos de *Anabaena* sp. en diferentes condiciones de iluminación: estándar (50 $\mu\text{E/m}^2\cdot\text{s}$), alta luz (500 $\mu\text{E/m}^2\cdot\text{s}$) y baja luz (10 $\mu\text{E/m}^2\cdot\text{s}$). En diferentes condiciones de estrés oxidativo: 0 mM, 0'5 mM y 1 mM de agua oxigenada. Y también en diferentes condiciones de disponibilidad de zinc: 0'77 μM Zn (cultivo en medio BG-11 completo), presencia de trazas de zinc (medio BG-11 sin zinc en el suplemento, sólo conteniendo el que impurifica a los reactivos) y ausencia de zinc biodisponible (medio BG-11 tratado durante 12 horas con TPEN 20 μM , un quelante específico de zinc).

Tabla 2. Composición del medio BG-11

| | Gramos | Conc. final (mM) | | Gramos | Conc. Final (μM) |
|---|--------|---------------------|--|---------|----------------------------------|
| <i>Medio basal 1X (3 litros)</i> | | | <i>Suplemento 1000X (100 ml)</i> | | |
| NaNO ₃ | 4,05 | 16 | Citrato férrico amónico | 0,6 | 30 |
| NaHCO ₃ | 2,214 | 8,8 | Ácido cítrico | 0,6 | 30 |
| K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O | 0,12 | 0,2 | EDTA | 0,1 | 190 |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 0,108 | 0,25 | H ₃ BO ₃ | 0,286 | 46 |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,225 | 0,3 | MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,181 | 9,15 |
| Na ₂ CO ₃ | 0,06 | 0,2 | ZnSO ₄ x H ₂ O | 0,0138 | 0,77 |
| | | | Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O | 0,039 | 1,61 |
| | | | CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0,0079 | 0,32 |
| | | | CoCl ₂ | 0,00494 | 0,17 |

Tabla 3. Cepas empleadas

| Cepa | Características | Empleo | Procedencia |
|---------------------------|--|---------------------------------------|---|
| <i>Cepas E. coli</i> | | | |
| DH5 α | F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ - | Replicación y mantenimiento plásmidos | Invitrogen |
| BL21 (DE3) | F ⁻ <i>omp T, hsd S_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal,dcm</i> , (DE3) | Expresión | Invitrogen |
| CPB1893 | <i>mcr A⁻ mcr B⁻ M .Eco K⁺ R. Eco K⁻</i> | Conjugación | Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla, España |
| ED8654 | F ⁻ <i>e14⁻ (mcr A⁻) recA 56 lac-3 o lac Y1 galK2 gal T22 glnV44 supF58 met B1 hsdR514</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>trpR55</i> | Conjugación | IBVF, Sevilla, España |
| <i>Cepas Anabaena sp.</i> | | | |
| PCC 7120 | Wild type/silvestre | | Instituto Pasteur, París |
| Δ <i>furB</i> | Gen <i>furB</i> delecionado | | IBVF, Sevilla, España |
| VCS2770FurB | PCC 7120 conteniendo pAM2770:: <i>furB</i> ; sobreexpresa FurB | | Este estudio |

Tabla 4. Antibióticos empleados

| Antibiótico | Abreviatura | Concentración (μ g/ml) |
|-----------------|-------------|-----------------------------|
| Ampicilina | Amp | 50 |
| Kanamicina | Km | 50 |
| Cloramfenicol | Cm | 30 |
| Neomicina | Nm | 50 |
| Estreptomicina | St | 25 (2-5) |
| Espectinomicina | Sp | 100 (2-5) |

Nota: se muestran en cursiva las concentraciones empleadas en *Anabaena sp.*

3.2. Técnicas de trabajo con ácidos nucleicos

3.2.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Se realizó varias veces a lo largo del proyecto, para extraer plásmidos conservados en cepas de *E. coli*. En todos los casos se llevó a cabo con el GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad de los plásmidos se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y empleando como tampón TBE1X (90 mM TRIS/HCl pH8, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA). La visualización de las bandas se realizó por iluminación con luz

UV en un dispositivo adecuado (Gel Doc 2000, Bio-Rad). Finalmente, la cuantificación del DNA se llevó a cabo con el equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

3.2.2. Extracción de DNA genómico de *Anabaena* sp.

El DNA genómico de la cianobacteria se requirió para amplificar el gen de la proteína FurB y los distintos promotores para los ensayos de retardo en gel. Se extrajo a partir de un cultivo de *Anabaena* sp. PCC 7120 con 5-6 µg/ml clorofila, llevando a cabo algunas modificaciones del método previamente descrito (Cai and Wolk, 1990): se centrifugaron 50 ml de cultivo durante 10 minutos, 4000 rpm y 4°C y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en TRIS-HCl 10 mM pH8 y EDTA 0'1 mM. Se rompieron con SDS 10%, fenol-cloroformo (1:1) y perlas de vidrio. Se lavaron de forma sucesiva con fenol, fenol-cloroformo (1:1) y cloroformo hasta conseguir una fase acuosa completamente incolora. La precipitación del DNA se consiguió por adición de 1V de acetato de sodio 3M pH5'2 y 2V de etanol absoluto frío, incubación durante 1 hora a -80°C y centrifugación durante 15 minutos a 4°C y velocidad máxima. El DNA obtenido se lavó con etanol al 70% frío y se resuspendió en agua MQ estéril.

3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se empleó para amplificar el gen *furB* y los promotores para los ensayos EMSA a partir del DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120. Para la amplificación de *furB*, que iba a ser utilizado posteriormente para clonaje, se empleó la DNA polimerasa *Pfu* (Agilent), que es de alta fidelidad gracias a su actividad 3'→5' exonucleasa. Para los demás casos se empleó *Taq* polimerasa (BioTools). Las mezclas de reacción se prepararon siguiendo las instrucciones de los fabricantes y se utilizó un programa de PCR con las etapas que se describen a continuación:

1. Desnaturalización inicial (95°C, 5 min)
 2. Desnaturalización (95°C, 00:30)
 3. Hibridación (Tm-4, 00:30)
 4. Elongación (72°C, 1 min/Kb)
 5. Elongación final (72°C, 10 min)
 6. Conservación (4°C, ∞)
- } 30 ciclos

Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados

| Oligo | Secuencia (5'→3') | Finalidad |
|-------------|-----------------------------|---|
| 2770FurB_up | GGAATTCATATGAGAGCCATACGCACC | Clonaje |
| 2770FurB_dw | GCCCTAGGGATTTAAAGTGAGCGCAC | |
| seq2770_up | GCCCGAAGTATGACAGATTG | Secuenciación |
| seq2770_dw | GCGATTAAGTTGGGTAACG | |
| PsodB_up | GCTTAGTAGTCCCTTGC | EMSA promotor Fe-SOD (alr2938) de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| PsodB_dw | CATTTTGTGAAGTCCTCTC | |
| PGor-1 | CTCTCTGGACATCGCTTAGT | EMSA promotor glutation reductasa (all4968) de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| PGor-2 | CCAGAACCAGCACCAATTAC | |

| | | |
|------------------|------------------------------|--|
| ProN | CTCGCCTAGCAATTTAACAAC | EMSA promotor FurA (all1691) de <i>Anabaena sp.</i> PCC 7120 |
| ProC | GCCTTGAGCGAAGTATTTGTG | |
| Alr0523-1 | GTCTGTATGGATTAACACTATC | EMSA gen pecB (alr0523) de <i>Anabaena sp.</i> PCC 7120 |
| Alr0523-2 | CTGCCTGTTCAACTACTTTGG | |
| PfhuF-F | GCGGCTGGAGATGCGTTCGCCAGATGAC | EMSA promotor fhuF de <i>E. coli</i> |
| PfhuF-R | CCGCATACATCAGCCGCCCTGCAATCAG | |

La correcta amplificación y ausencia de contaminantes se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1'5% y los productos obtenidos se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta etapa se realiza con el objetivo de eliminar los reactivos sobrantes de la PCR, principalmente los oligonucleótidos y dNTPs, que podrían interferir en etapas posteriores del experimento.

3.2.4. Digestión enzimática doble y ligación

Para obtener el plásmido de sobreexpresión de FurB (pAM2770::*furB*), se realizó una digestión enzimática doble del gen *furB* y del plásmido pAM2770 en el cual se iba a clonar, con la finalidad de que el clonaje fuera direccional. La restricción se hizo con las enzimas BamHI y NdeI (Fermentas) en Tango buffer 2X. Una vez cortados el inserto y el vector, se realizó la ligación con T4 DNA ligasa (Promega), dejando la mezcla durante dos horas a temperatura ambiente y a 4°C O/N. La mezcla de ligación se transformó por choque térmico en células DH5α competentes, que se sembraron en placa de LBA/Km. Se extrajo el DNA plasmídico de algunas de las colonias resultantes de la ligación y, mediante PCR del gen *furB*, se encontró la colonia conteniendo el plásmido pAM2770::*furB*. La correcta integración del gen en el vector se comprobó mediante secuenciación.

3.3. Métodos genéticos

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

La introducción de DNA en las células competentes de *E. coli* (DH5α para la conservación de plásmidos y CPB1893 para llevar a cabo la conjugación) se llevó a cabo mediante transformación por choque térmico. Para ello se siguió este protocolo: sobre células competentes recién descongeladas se añadió la cantidad adecuada del DNA a introducir (aprox. 100 ng) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Se introdujeron durante 90 segundos en un termobloque a 42° y durante 2 minutos en hielo. Después, se añadió a las células medio LB sin antibiótico y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se sembraron en LBA con el antibiótico adecuado para llevar a cabo la selección de los clones recombinantes.

Las células competentes arriba mencionadas se elaboraron de esta forma: se inoculó una colonia de la cepa deseada en 10 ml de medio líquido LB (con el antibiótico necesario) y se incubó a 37°C y 180 rpm O/N. Se refrescó el cultivo O/N en 200 ml de medio LB. Una vez alcanzada la fase exponencial del crecimiento ($DO_{600} = 0.3-0.4$), se incubó durante 20 minutos en hielo y centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm y 4°C, eliminando a continuación el sobrenadante. El pellet se resuspendió en Buffer 1 ($CaCl_2$ 0.13 M; $MgCl_2$ 0.15 M; NaAc 0.04 M) y se volvió a centrifugar. El pellet se resuspendió en Buffer 2 ($CaCl_2$ 0.13 M; glicerol 15%) y se repartió en tubos eppendorf a razón de 200 μ l en cada uno. Los tubos conteniendo las células competentes se guardaron a -80°C hasta su uso.

3.3.2. Conjugación triparental en *Anabaena* sp.

La conjugación triparental se empleó en este proyecto para la obtención de una cepa de *Anabaena* sp. sobreexpresando la proteína FurB. Aunque es un procedimiento complejo, se ha demostrado que es el método más eficaz para introducir DNA exógeno en *Anabaena* que, como ya se ha explicado, tiene una gruesa pared celular que dificulta la transformación por métodos más sencillos (Elhai *et al.*, 1997). En la conjugación triparental realizada intervienen tres cepas:

- *Anabaena* sp. PCC 7120: es la cepa receptora del plásmido de interés pAM2770::*furB*, que se describirá a continuación.
- *E. coli* ED8654: actúa como cepa donadora. Contiene el plásmido conjugativo pRL443, con los genes necesarios para la formación del *pilus* conjugativo.
- *E. coli* CPB1893: actúa como cepa helper o ayudante. Contiene el plásmido helper pRL623, con la región *mob* que codifica proteínas necesarias para la movilización como, por ejemplo, la proteína que reconoce la región oriT y la corta para iniciar la transferencia; también codifica metilasas de *Anabaena*. Esta cepa se transforma posteriormente con el plásmido de interés, que contiene el origen de transferencia (oriT).

Así, en una primera etapa de la conjugación, se produce la transferencia del plásmido conjugativo pRL623 a la cepa CPB1893 de *E. coli*. En esa cepa, el plásmido de interés es metilado para no ser reconocido por las enzimas de restricción *Ava*I, II y III de *Anabaena*. Finalmente, el plásmido de interés es transferido a *Anabaena*, en donde se replicará de forma independiente.

Para comprender mejor el proceso conjugativo, conviene describir en primer lugar el plásmido de interés, pAM2770::*furB*, que es el plásmido que se quiere introducir en la cianobacteria para sobreexpresar la proteína FurB. Contiene el gen *furB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (*all2473*) entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Nde*I del vector pAM2770, que fue cedido por el Dr. James W. Golden (Texas A&M University, College Station, TX, USA) y tiene los siguientes elementos a destacar:

- Origen de replicación en *E. coli*
- Origen de replicación en *Anabaena*
- Marcador de selección en *E. coli* (Km^R)
- Marcador de selección en *Anabaena* (Nm^R)
- Promotor petE de la plastocianina de *Anabaena*, que es inducible con cobre

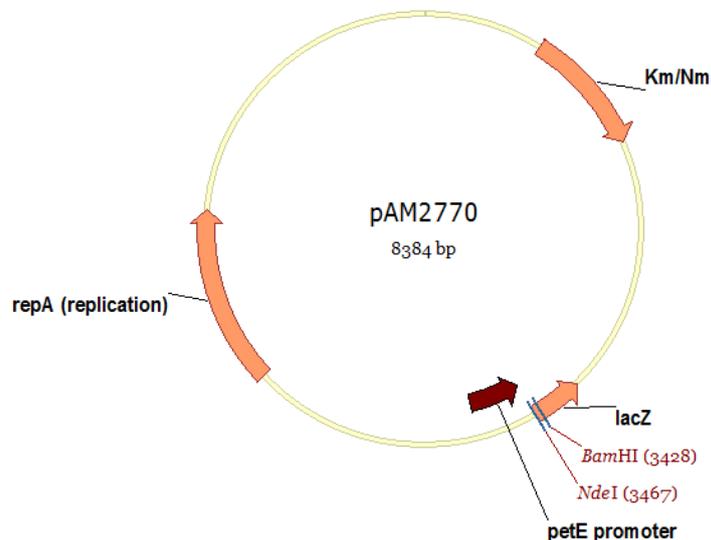


Figura 7. Esquema del vector pAM2770. El vector tiene un tamaño de 8384 pb. Se muestra el promotor petE, tras el cual se clonó *furB*. Se muestran también los genes de resistencia a antibióticos (Km/Nm) y la región repA necesaria para la replicación del plásmido. Imagen realizada con Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen).

Se trata por lo tanto de un vector lanzadera, ya que tiene los elementos necesarios (origen de replicación y marcador de selección) para trabajar en *E. coli* y también en *Anabaena sp.*

Así, para realizar la conjugación y obtener la cepa de sobreexpresión de FurB se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- 1) Se introdujo el plásmido de sobreexpresión pAM2770::*furB* en células competentes de *E. coli* CPB1893 mediante transformación por choque térmico.
- 2) Se realizó un cultivo O/N a 37°C de la cepa CPB1893 transformada en medio LB/Km/Cm y otro de *E. coli* ED8654 en medio LB/Amp
- 3) Al día siguiente, se refrescaron ambos cultivos hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Una vez alcanzada, se lavaron de forma sucesiva con 10 y 5 ml de medio LB, para eliminar los antibióticos.
- 4) Se añadió la cepa CPB1893 sobre la ED8654 y se incubaron durante 2 horas en oscuridad y sin agitación. Con esto se consigue la transferencia del plásmido conjugativo desde ED8654 hasta CPB1893.
- 5) Transcurridas las dos horas, se añadió sobre las dos cepas de *E. coli* la cantidad adecuada del cultivo de *Anabaena sp.* PCC 7120 en fase exponencial de crecimiento (3µg de clorofila).

- 6) La mezcla de las tres cepas se extendió sobre un filtro estéril (Whatman) colocado sobre una placa de medio BG-11 con el 5% de LB, para permitir el desarrollo de las cepas de *E. coli*.
- 7) A las 24 horas, el filtro se cambió a una placa de BG-11 y, al cabo de otras 24 horas, a una placa de BG-11 con neomicina (Nm).
- 8) El filtro se cambió a una placa nueva de BG-11 con Nm cada 24 horas durante los primeros días, hasta eliminar completamente el fondo de cianobacterias no exconjugantes (al cabo de aproximadamente 20 días desde el inicio de la conjugación). Una vez eliminado el fondo, el filtro se cambió de placa cada 2-3 días hasta observar la aparición de colonias aisladas de cianobacterias (al cabo de aproximadamente 50 días desde el inicio).
- 9) Una vez que el tamaño de las colonias aisladas fue suficiente, se sembraron en placas de BG-11/Nm para obtener mayor cantidad de biomasa y después se realizaron cultivos líquidos de 50 ml, que se indujeron convenientemente para luego analizar el nivel de sobreexpresión de FurB.

La conjugación triparental también se empleó para obtener la otra cepa de *Anabaena* sp. utilizada en este proyecto, la cepa con el gen *furB* deletado: *Anabaena* $\Delta furB$. Esta cepa fue cedida por el Dr. Ignacio Luque (Instituto de Bioquímica vegetal y Fotosíntesis, Sevilla) y se construyó de la siguiente manera: se amplificó mediante PCR un fragmento del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 conteniendo el gen *furB* flanqueado por unas 600 pb por cada extremo y se clonó en un vector pSPARK[®] (Canvax). El plásmido resultante se amplificó por PCR inversa con primers divergentes y se ligó con el cassette C.S3 (St^R y Sp^R) en la misma orientación en la que estaba el gen *furB*. De esta manera se obtuvo un vector pSPARK con el cassette C.S3 flanqueado en cada extremo por los 600 pb ya mencionados. El fragmento del vector conteniendo el gen *furB* inactivado se clonó después en el plásmido pRL278. El plásmido obtenido (pCMN38) se introdujo por conjugación en *Anabaena*. Una vez dentro de la cianobacteria, por recombinación homóloga, se produce la inserción del cassette C.S3 en el gen *furB* del cromosoma, de tal manera que este gen queda inactivado. Para este proyecto, se comprobó la identidad de la cepa de deleción por medio de Western Blot con anticuerpos anti-FurB, tal y como se describe en el apartado 3.7.1, esperando no observar la banda correspondiente a la proteína FurB que sí que se observa en la cepa de *Anabaena* sp. silvestre.

3.4. Métodos analíticos

A lo largo del proyecto se emplearon distintos métodos analíticos con el fin de caracterizar fenotípicamente el mutante de delección del gen *furB*, *Anabaena* $\Delta furB$. Para ello, se aplicaron los distintos métodos tanto a la estirpe silvestre como al mutante de delección $\Delta furB$.

3.4.1. Determinación de la velocidad de crecimiento y tasa de duplicación

Para comparar el crecimiento de las cepas, se realizaron medidas de la densidad óptica de las células a 750 nm cada 2-3 días durante aproximadamente un mes. A partir de los valores obtenidos se calcularon la velocidad de crecimiento específica (μ) y la tasa de duplicación (τ) aplicando las siguientes fórmulas:

$$\mu = \frac{\text{Ln}(\text{Abs}750_2 / \text{Abs}750_1)}{t_2 - t_1}$$

$$\tau = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian).

3.4.2. Determinación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales

Se comparó el contenido en pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas) de las cepas en la fase exponencial de crecimiento y también en la fase exponencial tardía.

La determinación del contenido en **clorofila a** se llevó a cabo con ligeras modificaciones del método previamente descrito (Nicolaisen *et al.*, 2008). Se añadió 1 ml de metanol sobre 200 μ l de cultivo y se homogeneizó en vórtex durante un minuto para romper completamente las células. Se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm para depositar los restos celulares. Por último, se midió la absorbancia del sobrenadante a 665 nm y se calculó la concentración de clorofila a de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Chl } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs}665}{74'46 \frac{\text{mg}}{\text{ml} \cdot \text{cm}} \cdot 1\text{cm}} \cdot 1000 \cdot 6$$

La determinación de **carotenoides** se llevó a cabo según el método previamente descrito (Davies, 1976). Se centrifugaron 50 ml de cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos y 4°C y se lavó el pellet de células dos veces con 5 ml de agua destilada. Una vez resuspendidas en 5 ml de agua destilada, se sonicaron las células 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos, empleando una amplitud del 80% y ciclo 0'5.

A continuación, se añadieron 4V de acetona, se centrifugó a 2500g durante 5 minutos y 4°C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 480, 465 y 663 nm, empleando como blanco acetona al 80%. La concentración de carotenoides se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

$$Abs_{480} \text{ carotenoides} = Abs_{480} + 0'114 \cdot Abs_{663} - 0'638 \cdot Abs_{465}$$

$$c \text{ carotenoides} \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs_{480} \text{ carotenoides}}{\varepsilon \cdot l} = \frac{Abs_{480} \text{ carotenoides}}{250 \text{ mg}^{-1} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}}$$

La determinación de **ficobiliproteínas** se llevó a cabo por el método previamente descrito (Glazer, 1976). Se centrifugaron 50 ml de cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos y 4°C y se lavó el pellet de células dos veces con 5 ml de agua destilada. Una vez resuspendidas en 5 ml de agua destilada, se sonicaron las células 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos, empleando una amplitud del 80% y ciclo 0'5. A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm, empleando agua como blanco. La concentración de ficobiliproteínas se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$c \text{ ficobiliproteínas} \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs_{620}}{\varepsilon \cdot l} = \frac{Abs_{620}}{7'41 \text{ mg}^{-1} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}}$$

La determinación de **proteínas totales** se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinconínico (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific), con la sonicación previa de las células en las condiciones ya descritas. Este método se basa en la capacidad del enlace peptídico de reducir Cu^{2+} a Cu^{+} en medio alcalino. Los iones Cu^{+} se unen al BCA, cambiando su estructura electrónica y haciendo que absorba a 562 nm. La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente, de tal manera que es posible calcular esta concentración interpolando en la recta de calibrado del método.

El contenido en pigmentos y proteínas se expresa como miligramos de pigmento/proteína por volumen celular empaquetado (PCV), en donde el PCV son los microlitros de células que hay en un mililitro de cultivo. Para calcular este PCV, se añadió 1 ml del cultivo correspondiente en un tubo hematocrito graduado, se centrifugó a 2000g durante 10 minutos y 4°C y se anotó el volumen ocupado por el pellet de células. Se emplea el PCV como medida alternativa del crecimiento porque es independiente del contenido en pigmentos de la cepa. Como se verá más adelante, las cepas empleadas difieren en su contenido en clorofila *a*, pero no en su tamaño celular. Por lo tanto, es más correcto expresar las medidas en función del PCV que en función del contenido en clorofila *a*.

Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian) y, en todos los casos, se mantuvieron los extractos proteicos en tubos protegidos de la luz para evitar la fotodegradación de los pigmentos.

3.4.3. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Se determinó la cantidad de ROS, concretamente de agua oxigenada, presente en ambas cepas en la fase exponencial tardía del crecimiento. Para ello se empleó el método del ferritocianato, con algunas modificaciones del protocolo descrito por otros autores (Thurman *et al.*, 1972; Molin *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010). El método consiste en la oxidación del Fe^{2+} de la sal de Mohr ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) a Fe^{3+} por parte del agua oxigenada en medio ácido. El Fe^{3+} resultante forma un complejo con los iones SCN^- del tiocianato potásico que absorbe a 480 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de agua oxigenada presente en la muestra, siendo el rango de linealidad del método de 0-7 μmol de H_2O_2 en las condiciones empleadas.

El protocolo diseñado fue el siguiente: se añadieron unos 50-100 mg de células en un tubo eppendorf y se rompieron con TCA al 5%. A continuación, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 5 minutos y 4°C para depositar los restos celulares y proteínas. Por último, 800 μl del sobrenadante se mezclaron en una cubeta espectrofotométrica con 160 μl de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 10 mM (concentración final 1'3 mM), 80 μl de KSCN 2'5 M (conc. final 167 mM) y 160 μl de TCA al 50%, añadidos en este orden. Rápidamente, se midió la absorbancia de la mezcla a 480 nm, frente a un blanco conteniendo agua MQ en lugar de extracto. El valor de absorbancia obtenido se interpoló en la recta de calibrado del método (Abs vs. $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$), que fue realizada con los siguientes volúmenes de reactivos y que tiene un coeficiente de correlación >0'999.

| H ₂ O MQ (μl) | H ₂ O ₂ 0'194 M (μl) | Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 10 mM (μl) | KSCN 2'5 M (μl) | TCA 50% (μl) | H ₂ O ₂ (μmol) |
|--|--|--|---------------------------------|------------------------------|--|
| 800 | 0 | 160 | 80 | 160 | 0 |
| 794'8 | 5'2 | 160 | 80 | 160 | 1'0088 |
| 789'8 | 10'2 | 160 | 80 | 160 | 1'9788 |
| 784'4 | 15'6 | 160 | 80 | 160 | 3'0264 |
| 779'4 | 20'6 | 160 | 80 | 160 | 3'9964 |
| 774'2 | 25'8 | 160 | 80 | 160 | 5'0052 |
| 764 | 36 | 160 | 80 | 160 | 6'984 |

Tabla 6. Composición de los patrones de la recta de calibrado del método del ferritocianato.

El resultado se expresa como nmoles H_2O_2 por mg de peso fresco (FW). Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian).

3.4.4. Determinación de la actividad catalasa

Para la determinación de la actividad catalasa se realizaron algunas modificaciones del protocolo descrito por otros autores (Beers and Sizer, 1952; González *et al.*, 2010). La catalasa es la enzima que cataliza la descomposición del agua oxigenada ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) y este método se basa en que el agua oxigenada absorbe a una longitud de onda de 240 nm, pero no así los productos de la reacción. De esta manera, si se añade agua oxigenada al extracto proteico de *Anabaena* que contiene enzima catalasa, la evolución de la reacción puede seguirse por la disminución de la absorbancia a 240 nm.

El protocolo diseñado fue el siguiente: se centrifugaron 50 ml de cultivo (en la fase exponencial tardía) a 4000 rpm durante 10 minutos y 4°C y el pellet de células se resuspendió en 1 ml de buffer fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 50 mM pH7. Se sonicaron las células y se determinó la cantidad de proteínas totales mediante el método del BCA. A continuación, unos 300-600 µg del extracto proteico se mezclaron en una cubeta de cuarzo con H_2O_2 hasta una concentración final de 20 mM y se midió rápidamente la absorbancia a 240 nm a lo largo del tiempo (a intervalos de 1 segundo durante 5 minutos). Se empleó un blanco conteniendo la misma cantidad de extracto proteico pero no agua oxigenada. Finalmente, la actividad de la enzima catalasa se calcula como:

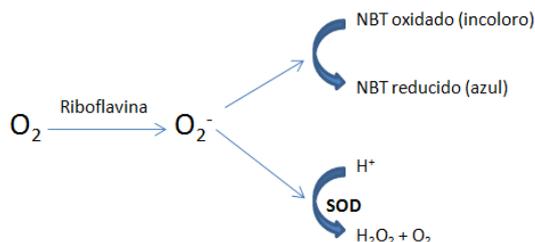
$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{\Delta Abs_{240}}{min} \cdot 1000}{43'6 \cdot \frac{mg \text{ proteínas}}{ml \text{ reacción}}}$$

Nota: se define 1U como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 µmol de H_2O_2 /minuto.

Todas las medidas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible (Varian).

3.4.5. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó con algunas modificaciones del método previamente descrito (Winterbourn *et al.*, 1975; Lai *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010). La SOD es la enzima que cataliza la reacción: $\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ y el fundamento de este método se basa en su capacidad para bloquear la reducción del colorante nitro-azul de tetrazolio (NBT) por los aniones O_2^- . La forma oxidada del NBT es incolora, mientras que la reducida es azul (absorbe a 560 nm). Los aniones O_2^- se generan por la reducción del oxígeno del aire por parte de la riboflavina adicionada (ver esquema a continuación).



El protocolo empleado fue el siguiente: se centrifugaron 50 ml de cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos y $4^\circ C$ y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de buffer fosfato 67 mM pH7'8 y se sonicó en las condiciones ya descritas. A continuación, se centrifugó el sonicado durante 5 minutos a 14000 rpm y $4^\circ C$ para depositar los restos celulares. Se determinó la concentración de proteínas del extracto resultante mediante el método del BCA y, en cubetas espectrofotométricas de plástico, se prepararon las mezclas de reacción:

| Cubeta | Extracto | Buffer fosfato 67 mM pH7'8 | EDTA 100 mM (conc final 6'4 mM) | NBT 1'2 mM (conc final 41 μM) | Volumen total (μl) |
|-------------|-------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Blanco (x2) | - | 900 | 65 | 35 | 1000 |
| C. negativo | - | 900 | 65 | 35 | 1000 |
| Muestra | 600 μg | Completar | 65 | 35 | 1000 |

A continuación, se añadieron 20 μl de riboflavina (conc. final 2'4 μM) a las cubetas del control negativo y de la muestra, se homogeneizaron adecuadamente y se incubaron durante 10 minutos bajo iluminación de 20W. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia de la muestra a 560 nm frente al blanco, tomando medidas cada 1 segundo durante 5 minutos. Finalmente, se determina la $\Delta Abs_{560}/min$ en el control negativo (en el cual la variación será máxima porque no hay SOD) y en la muestra. El porcentaje de inhibición de la SOD se calcula como:

$$\%inhibición = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right)_{control\ negativo} - \left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right)_{muestra}}{\left(\frac{\Delta Abs_{560}}{min}\right)_{control\ negativo}} \times 100$$

Puesto que 1 U de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que provoca una inhibición del 50%:

$$Actividad (U) = \frac{\%inhibición}{50}$$

Por último, dividiendo las U entre los mg de proteínas de extracto proteico que hemos añadido en la cubeta, se tiene la actividad expresada como U/mg.

3.5. Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria

La determinación de la tasa fotosintética y respiratoria se llevó a cabo mediante la medida de la producción/desaparición de oxígeno a lo largo del tiempo con un electrodo de tipo Clark, que consta de un cátodo de platino y un ánodo de plata (ver figura 8). Concretamente, en este trabajo se empleó el dispositivo Oxytherm (Hansatech), que contiene el electrodo de oxígeno recubierto de una cámara de reacción termostatazada.

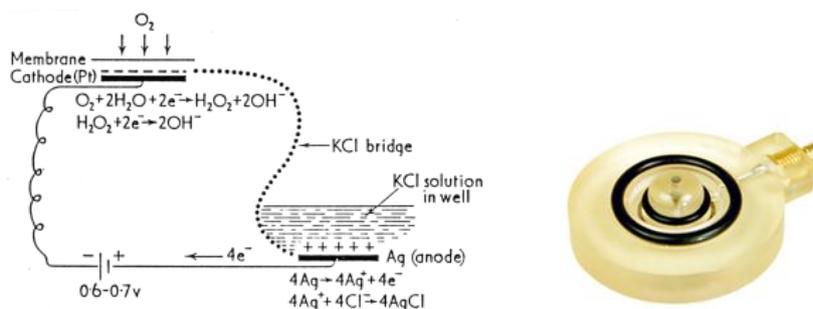


Figura 8. Electrodo de oxígeno. A la izquierda, esquema de funcionamiento del electrodo: al aplicar un potencial, el platino se carga negativamente y la plata positivamente. El oxígeno difunde a través de la membrana y es reducido en la superficie del cátodo, generándose una corriente eléctrica. La plata se oxida y el $AgCl$ formado se deposita en el ánodo. La corriente generada es proporcional al oxígeno reducido. A la derecha, imagen real del electrodo, en el cual, el ánodo y el cátodo se encuentran insertados en una resina epoxi. Tomado de Hansatech.

Para la preparación del electrodo, se añadieron unas gotas de KCl 2 M sobre el ánodo y el cátodo y se cubrieron de forma sucesiva con una lámina de papel y con una membrana PTFE de teflón permeable a oxígeno, que se fijaron con aros de goma. De esta manera el ánodo y el cátodo quedan comunicados por un puente de la disolución de KCl . A continuación se llevó a cabo la calibración del electrodo, simulando las condiciones extremas de concentración de oxígeno:

- Concentración máxima: se introdujo en la cámara de reacción agua destilada bien aireada
- Concentración mínima: se introdujo una disolución de ditionito de sodio, que consume el oxígeno a través de esta reacción: $Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O \rightarrow NaHSO_4 + NaHSO_3$.

Una vez calibrado el instrumento, se procedió a tomar las medidas en cultivos en la fase exponencial de crecimiento. Las medidas se realizaron por duplicado y empleando los siguientes parámetros: temperatura de $25^\circ C$ y agitación del 65% (para asegurar la distribución homogénea del oxígeno dentro de la cámara). Para determinar la evolución del oxígeno durante la fotosíntesis se empleó una iluminación de $400 \mu E/m^2 \cdot s$ y, para determinar la evolución durante la respiración, se cubrió

completamente la cámara de reacción con papel de aluminio, minimizando la entrada de luz del exterior. Finalmente, la variación total en la cantidad de oxígeno se calculó como la suma de la variación durante la fotosíntesis y la respiración. Todos los resultados vienen expresados como $\mu\text{molO}_2/\text{mg Chl } a \cdot \text{h}$.

3.6. Microscopía

Se emplearon técnicas de microscopía para comparar la morfología, fluorescencia intrínseca y ultraestructura de las cepas *Anabaena* $\Delta furB$ y silvestre.

3.6.1. Microscopía óptica y de fluorescencia

La morfología y fluorescencia intrínseca de las células se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-fluorescence acoplado con una cámara Nikon DXM 1200F. Para ello, se tomaron muestras de cultivo líquido de ambas cepas en la fase exponencial del crecimiento.

3.6.2. Microscopía electrónica

La ultraestructura de las células se analizó por microscopía electrónica de transmisión con un microscopio TECNAI a 120V y también por microscopía electrónica de barrido con un microscopio SEM JEOL JSM 7001FA. Para ello, se fijaron las células en fase exponencial del crecimiento con glutaraldehído al 2'5% (Polysciences) y se enviaron al Laboratory of Bioenergetics and Microbiology (University of Geneva, Switzerland), en donde se realizó el tratamiento posterior: fijación de las muestras con tetróxido de osmio al 2%, deshidratación con etanol, infiltración en una resina Spurr, corte de las secciones con ultramicrotomo y tinción con acetato de uranilo.

3.7. Técnicas de estudio de proteínas

Se aplicaron distintas técnicas de estudio de proteínas para analizar el nivel de expresión de FurB en diferentes condiciones de cultivo y analizar su capacidad de unión *in vitro* a distintos promotores.

3.7.1. Western blot

Esta técnica se empleó para determinar la colonia exconjugante de *Anabaena* con mayor sobreexpresión de FurB durante el proceso conjugativo de obtención del mutante VCS2770FurB, y también para comparar el nivel de expresión de la proteína FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 sometida a diferentes condiciones nutricionales y de estrés.

En todos los casos, se concentraron 50 ml de cultivo en la fase adecuada de crecimiento hasta un volumen final de 1-5 ml y se determinó la concentración de proteínas del extracto mediante el método del ácido bicinconínico ya descrito. Así, se cargaron 10-30 µg de proteínas totales en geles de SDS-PAGE al 17% y se sometieron a un amperaje de 35 mA durante 45-60 minutos. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, aplicando un voltaje de 15V durante 60 minutos. La membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente en una disolución de TBST (50 mM TRIS-HCl pH7'5; 150 mM NaCl; 0'1 % Tween 20) y leche descremada al 4 %. Tras efectuar 3 lavados de 5 minutos con TBST, se incubó durante una hora con los anticuerpos policlonales anti-FurB diluidos 1:1000 en TBST. Tras lavar de nuevo con TBST, se incubó durante otra hora con anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa. A continuación, se lavó 3 veces con TBST y 2 veces con tampón fosfocitrato (24'3 mM ácido cítrico; 5'14 mM Na₂HPO₄ pH5'3). Finalmente, se introdujo en la disolución de revelado (20 mg TMB; 80 mg DONS; 10 ml etanol absoluto; 15 µl H₂O₂) hasta observar la aparición de las bandas de proteína en color azul.

3.7.2. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

La afinidad *in vitro* de la proteína FurB con distintos fragmentos de DNA se analizó mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoresis Mobility Shift Assay, EMSA). Esta técnica se basa en que, al producirse la interacción DNA-proteína, se forman complejos que tienen un mayor peso molecular que el DNA libre. Por lo tanto, estos complejos pueden diferenciarse del DNA libre porque tienen una menor movilidad electroforética. En todos los casos, el ensayo se realizó en presencia de un DNA competidor al cual no se une FurB para asegurar que la interacción observada es específica.

La proteína FurB empleada en estos ensayos contiene una cola de histidinas (necesaria para su purificación por cromatografía de afinidad a zinc en una columna Matrix Chelating Sepharose™ Fast Flow de Amersham) y se encuentra en una disolución 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl. Mediante estudios previos en este laboratorio, se determinó que la cola de histidinas no afectaba a la unión de FurB al DNA.

Los fragmentos de DNA empleados se obtuvieron por la técnica de PCR, con los oligonucleótidos descritos en la tabla 5 del apartado 3.2.3. Se purificaron y cuantificaron como también se ha descrito en ese apartado. Para el ensayo se emplearon geles no desnaturizantes con un porcentaje de poliacrilamida del 6% (ver composición en la tabla 7), que es un porcentaje lo suficientemente bajo como para permitir la migración de los posibles complejos.

| Reactivo | Volumen |
|--|------------|
| Acrilamida:bisacrilamida 30% | 2,06 ml |
| Running Buffer 5X (30'28 g/l TRIS, 142 g/l glicina, pH8) | 1,86 ml |
| Glicerol 50% | 1,4 ml |
| Agua MQ | 4,86 ml |
| APS 10% | 50 μ l |
| TEMED | 20 μ l |

Tabla 7. Mezcla para 1 gel PAGE al 6%

Las mezclas de reacción, con un volumen final de 20 μ l, contenían: 50 ng de cada uno de los promotores (inespecífico y promotor a analizar), 250 nM de proteína, tampón de unión 1X (10 mM bis-Tris pH7'5, 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂·6H₂O y glicerol 5%) y 0'05 mg/ml de BSA; de tal manera que se simulan las condiciones del interior celular. Además, en función de las condiciones a estudiar, se añadieron a la mezcla de reacción: MnCl₂ a una concentración de 1 mM (actúa como correpresor, estabilizando la unión de FurA con el DNA), DTT 1 mM (actúa reduciendo las cisteínas) y ZnSO₄·H₂O a concentración 5 μ M, 10 μ M ó 50 μ M (actúa como correpresor, estabilizando la unión de FurB con el DNA). Las mezclas resultantes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se les añadió 3 μ l de tampón de carga (50 mM TRIS-HCl pH8, glicerol 30%, 0'25% p/v de azul de bromofenol y 0'25% p/v de xilenocianol).

Los geles de electroforesis preparados se precorrieron durante 45 minutos a 60V y 4°C, para eliminar residuos que pudieran dificultar la movilidad de las muestras y equilibrar el gel. Transcurrido ese tiempo, se cargaron las muestras y se corrieron durante aproximadamente 2 horas a 90V y 4°C. Los geles se tiñeron en cubetas conteniendo 50 ml de Running Buffer 5X y 5 μ l de SYBR®Safe 10000X (Invitrogen) y se visualizaron en un dispositivo GelDoc 2000 (BioRad).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterización fenotípica de *Anabaena* $\Delta furB$

Se llevó a cabo la caracterización fenotípica de la cepa de *Anabaena* sp. con el gen *furB* interrumpido por el cassette de resistencia C.S3, que fue cedida amablemente a nuestro laboratorio por el Dr. Ignacio Luque (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Sevilla). La cepa se caracterizó morfológicamente mediante diversas técnicas de microscopía y se analizó su velocidad de crecimiento, contenido en pigmentos fotosintéticos y proteínas, especies reactivas de oxígeno, actividades catalasa y superóxido dismutasa y tasa de fotosíntesis y respiración. Pero, antes de proceder a ello, la no expresión del gen *furB* se comprobó mediante Western blot con anticuerpos policlonales anti-FurB (ver figura 9 a continuación) tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

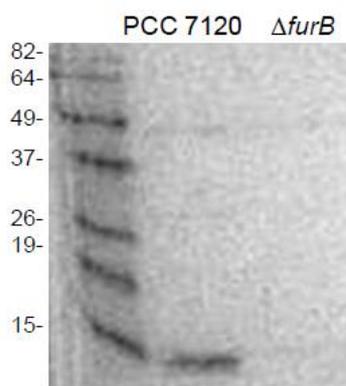


Figura 9. Western blot con α FurB para analizar *Anabaena* $\Delta furB$. El carril 1 contiene 30 μ g de extracto proteico de *Anabaena* sp. PCC 7120 (estirpe silvestre). El carril 2 contiene 30 μ g de extracto proteico de *Anabaena* $\Delta furB$. Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

Como se muestra en la figura 9, el carril con extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta una única banda, correspondiente a la forma monomérica de la proteína FurB, que tiene un peso molecular de 15.116'4 Da. En el carril con extracto de *Anabaena* $\Delta furB$ se observan bandas muy tenues correspondientes a uniones inespecíficas del anticuerpo.

4.1.1. Caracterización morfológica

La morfología celular del mutante de delección $\Delta furB$ se comparó con la de la estirpe silvestre, *Anabaena* sp. PCC 7120, empleando diversas técnicas de microscopía entre las que se encuentran: microscopía óptica convencional y de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Bajo el microscopio óptico pudo observarse que las células de la estirpe silvestre contactan entre ellas para formar largos filamentos y tienen uniformidad en cuanto a

forma y tamaño (ver figura 10A). En cuanto a la cepa $\Delta furB$, las células no presentan diferencias apreciables en cuanto a forma y tamaño respecto a la estirpe silvestre y siguen formando largos filamentos (figura 10C). Las células de *Anabaena* sp. también pueden observarse por microscopía de fluorescencia, ya que son autofluorescentes debido a la ficocianina que contienen; una ficobiliproteína que emite fluorescencia en torno a 650 nm (zona del rojo). Bajo el microscopio de fluorescencia tampoco se apreciaron diferencias relevantes en la autofluorescencia de la cepa $\Delta furB$, siendo la intensidad de la fluorescencia la misma que en la estirpe silvestre (figuras 10B y 10D).

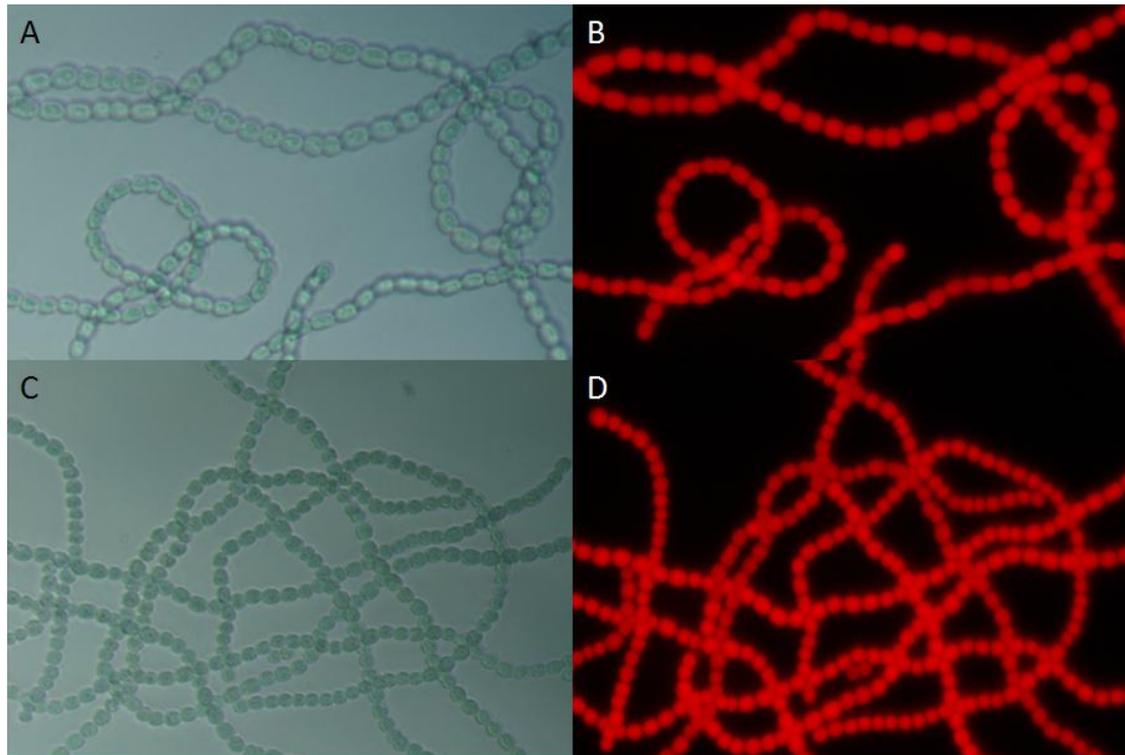


Figura 10. Imágenes de microscopía óptica convencional (A y C) y de fluorescencia (B y D). Las imágenes superiores (A y B) corresponden a *Anabaena* sp. PCC 7120. Las inferiores (C y D) corresponden a la cepa $\Delta furB$.

La ultraestructura de las células en ambas cepas se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión y también resultó muy similar, pudiendo apreciarse claramente en las imágenes las membranas tilacoidales, que contienen los pigmentos necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis, y regiones citoplásmicas más oscuras, que podrían ser los gránulos de glucógeno (figura 11).

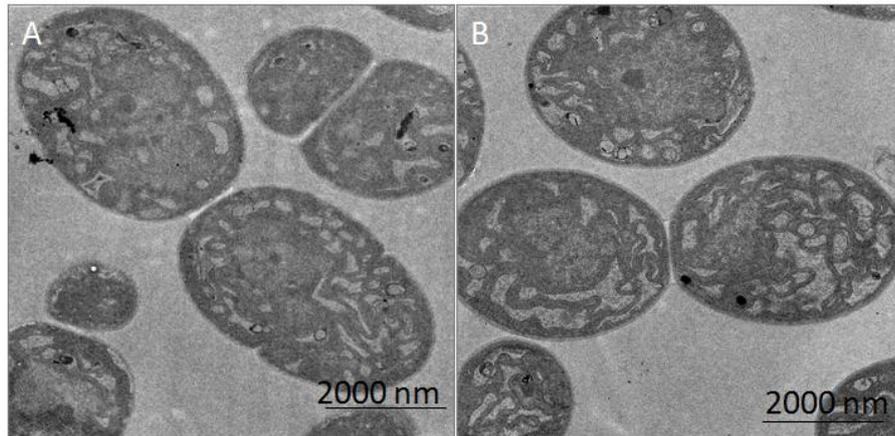


Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión. A) *Anabaena* sp. PCC 7120. B) *Anabaena* $\Delta furB$. La escala está indicada por las barras horizontales (2000 nm). Imágenes tomadas por el Dr. Francisco Barja (Laboratory of Bioenergetics and Microbiology, University of Geneva, Switzerland).

La superficie de las células y la región de contacto entre ellas se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido (figura 12). En estas imágenes sí que puede apreciarse como, en la cepa $\Delta furB$, la superficie de contacto entre células adyacentes, el septo, es menor.

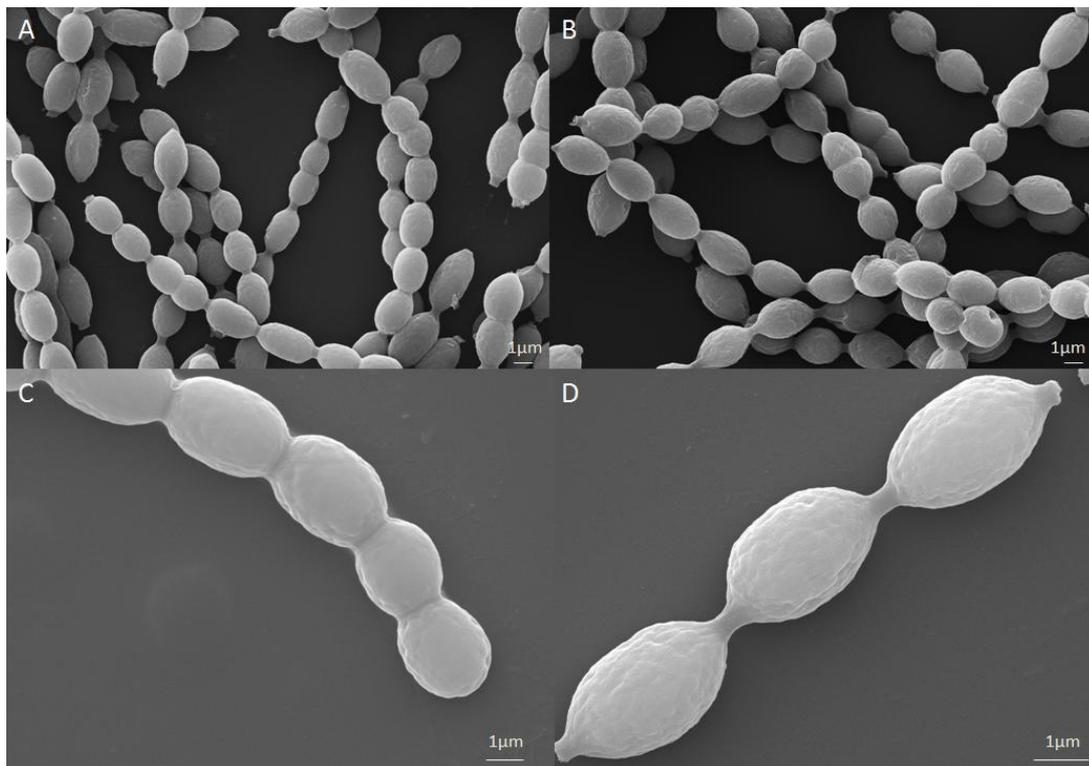


Figura 12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. A y C) *Anabaena* sp. PCC 7120. B y D) *Anabaena* $\Delta furB$. La escala está indicada por las barras horizontales (1 μ m). Imágenes tomadas por el Dr. Francisco Barja (Laboratory of Bioenergetics and Microbiology, University of Geneva, Switzerland).

En último lugar cabe señalar que, de forma casual, se observó una mayor liberación de pigmentos fotosintéticos en *Anabaena* $\Delta furB$ que en la estirpe silvestre cuando los cultivos en fase exponencial del crecimiento se dejaron durante 48 horas sin agitación y bajo iluminación y temperatura ambientes (figura 13).

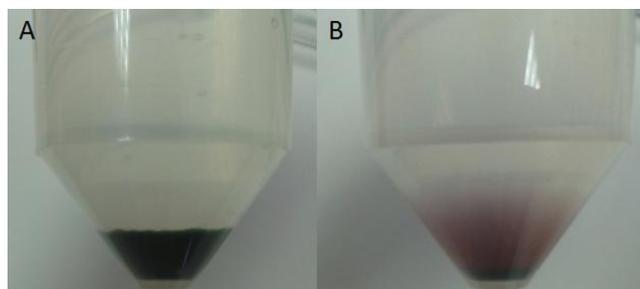


Figura 13. Cultivos al cabo de 48 horas sin agitación. A) *Anabaena* sp. PCC 7120. B) *Anabaena* $\Delta furB$.

En las figuras 13A y 13B puede apreciarse un sedimento verde de células de *Anabaena*. En la figura 13B se aprecia además un color rojizo debido a los pigmentos fotosintéticos liberados.

4.1.2. Determinación de la velocidad de crecimiento y tasa de duplicación

Con el fin de determinar la velocidad de crecimiento específica y tasa de duplicación de la estirpe silvestre y de la cepa $\Delta furB$, se midió la densidad óptica a 750 nm de cultivos de ambas cepas durante 38 días (figura 14). Los cultivos fueron crecidos en erlenmeyers de 250 ml en un incubador orbital.

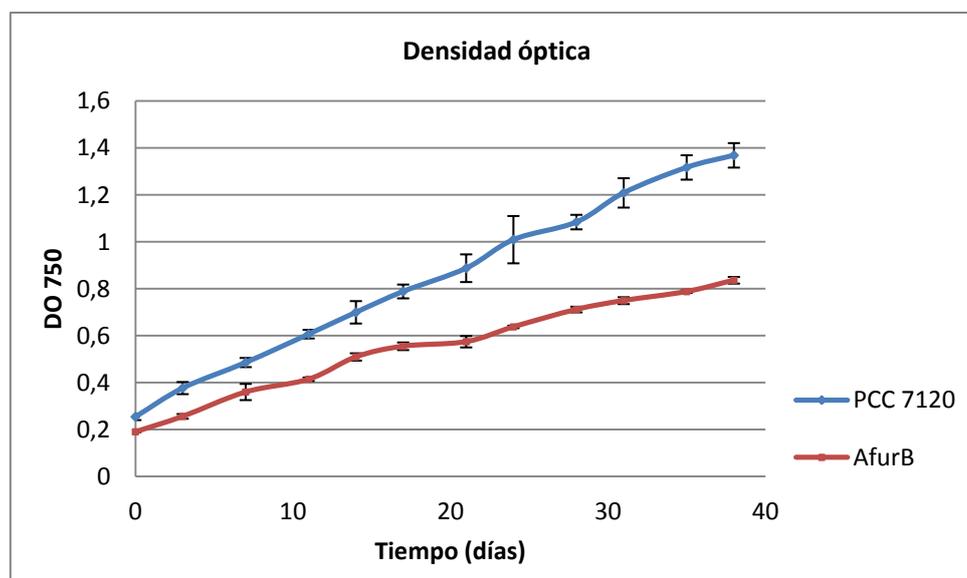


Figura 14. Evolución de la densidad óptica a 750 nm a lo largo del tiempo. En azul se muestran los valores para *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en rojo, para la cepa $\Delta furB$. Los valores corresponden a la media de tres medidas y la desviación estándar viene indicada por las líneas verticales.

A partir de los valores de densidad óptica que se muestran en la figura 14, se calcularon la velocidad de crecimiento específica (μ) y la tasa de duplicación (τ) para ambas cepas en el intervalo de máximo crecimiento de cada una de ellas:

| | PCC 7120 | $\Delta furB$ |
|-----------------------------|----------|---------------|
| μ (días ⁻¹) | 0,08 | 0,05 |
| τ (días) | 8,77 | 13,76 |

Tabla 8. Parámetros de crecimiento. Se muestran los valores obtenidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en *Anabaena* $\Delta furB$. Las unidades se indican entre paréntesis.

En la tabla 8 puede apreciarse como la cepa $\Delta furB$ tiene una menor velocidad de crecimiento y mayor tasa de duplicación que la estirpe silvestre, lo cual significa que su crecimiento es más lento en las condiciones estándar de cultivo empleadas.

Un método adicional de estudiar el crecimiento de las cianobacterias consiste en efectuar mediciones de su contenido en clorofila a a lo largo del tiempo (figura 15). Estas mediciones se llevaron a cabo de manera simultánea a las de densidad óptica, empleando para ello los mismos cultivos.

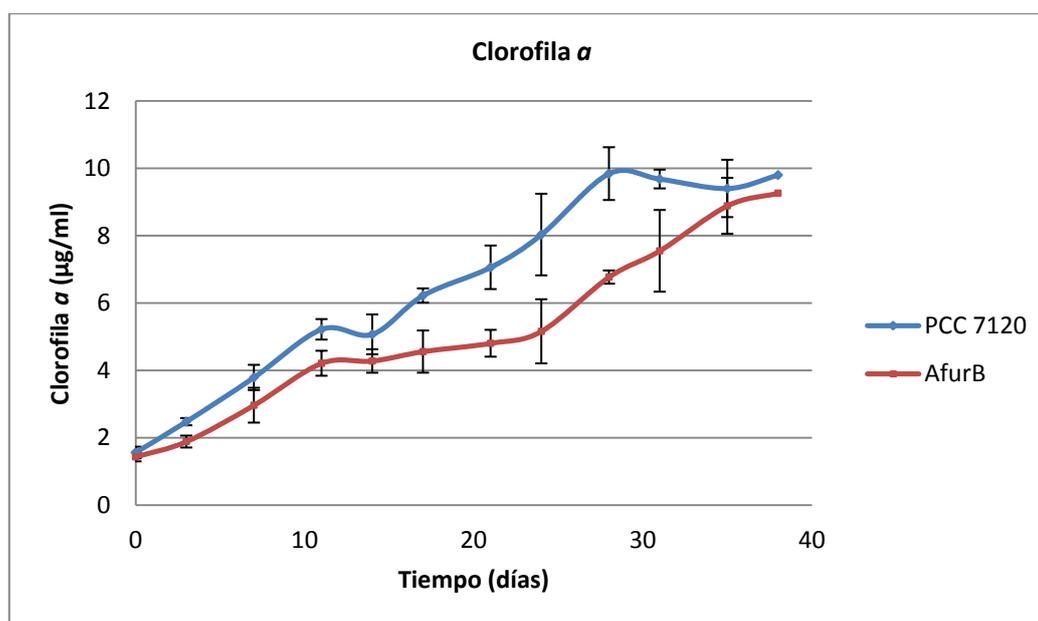


Figura 15. Evolución del contenido en clorofila a a lo largo del tiempo. En azul se muestran los valores para *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en rojo, para la cepa $\Delta furB$. Los valores corresponden a la media de tres medidas y la desviación estándar viene indicada por las líneas verticales.

En la figura 15 se observa como el contenido en clorofila a de la cepa $\Delta furB$ es menor que en la estirpe silvestre durante gran parte de la fase exponencial del crecimiento, pero alcanza valores muy semejantes al llegar a la fase estacionaria final.

4.1.3. Determinación de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales

La determinación de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides, ficobiliproteínas) y proteínas totales se llevó a cabo en la estirpe silvestre y en la cepa $\Delta furB$ tanto en la fase exponencial del crecimiento como en la fase exponencial tardía. La determinación de estos pigmentos es interesante porque son necesarios para el proceso fotosintético. Las ficobiliproteínas son, cuantitativamente, las principales proteínas de las cianobacterias, pudiendo llegar a constituir hasta el 50 % del total de proteínas solubles. Se encuentran en los ficobilisomas, unas estructuras localizadas en la superficie de las membranas tilacoidales y encargadas de la captación de la energía luminosa durante la fotosíntesis. La clorofila *a* es el segundo pigmento fotosintético en abundancia y también interviene en la captación de energía luminosa. Por último, los carotenoides son los pigmentos fotosintéticos menos abundantes en las cianobacterias y, al igual que los anteriores, intervienen en la captación de luz. Con esta variedad de pigmentos, la cianobacteria asegura la captación de energía luminosa en un amplio rango de longitudes de onda.

La determinación se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos y se emplearon cultivos crecidos en Frascos Roux de vidrio con agitación mediante burbujeo constante de aire.

| | Fase exponencial | | Fase exponencial tardía | |
|---------------------------|------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | PCC 7120 | $\Delta furB$ | PCC 7120 | $\Delta furB$ |
| Clorofila <i>a</i> | 2,16 ± 0,10 | 1,36 ± 0,04 | 2,63 ± 0,18 | 2,10 ± 0,11 |
| Carotenoides | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 |
| Ficobiliproteínas | 11,79 ± 0,06 | 14,11 ± 0,20 | 17,28 ± 0,24 | 15,39 ± 0,80 |
| Proteínas totales | 49,14 ± 0,75 | 62,13 ± 0,91 | 64,83 ± 0,76 | 63,70 ± 0,92 |

Tabla 9. Contenido en pigmentos fotosintéticos y proteínas totales. Se muestran los valores obtenidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en *Anabaena* $\Delta furB$. Los resultados son la media de tres determinaciones ± desviación estándar. Están expresados como μg pigmento ó proteína/PCV.

Como se aprecia en la tabla 9, la estirpe silvestre presenta un aumento evidente en la cantidad de proteínas totales en la fase exponencial tardía con respecto a la temprana. Este aumento no es tan pronunciado en la cepa $\Delta furB$. No obstante, para facilitar el análisis de los datos se muestra la tabla 10, en la cual las cantidades de cada pigmento se expresan con respecto al total de proteínas:

| | Fase exponencial | | Fase exponencial tardía | |
|--------------------|------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| | PCC 7120 | $\Delta furB$ | PCC 7120 | $\Delta furB$ |
| Clorofila <i>a</i> | 4,40 | 2,19 | 4,06 | 3,30 |
| Carotenoides | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| Ficobiliproteínas | 24,00 | 22,71 | 26,65 | 24,16 |

Tabla 10. Porcentaje de pigmentos fotosintéticos. Se muestran los valores obtenidos en *Anabaena* sp. PCC 7120 y en *Anabaena* $\Delta furB$. El porcentaje de cada pigmento se ha calculado con respecto a las proteínas totales. Para simplificar la interpretación de los datos, se muestra únicamente el valor medio.

En la tabla 10 se aprecia que el porcentaje de carotenoides es idéntico en ambas cepas, concretamente del 0,06%. Sin embargo, la cepa $\Delta furB$ tiene un menor porcentaje de clorofila *a*, concretamente de la mitad, que la estirpe silvestre en la fase exponencial del crecimiento, aunque esta diferencia disminuye en la fase exponencial tardía. La cepa $\Delta furB$ tiene también un menor porcentaje de ficobiliproteínas que la estirpe silvestre en ambas fases del crecimiento.

4.1.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Puesto que la proteína FurB protege al DNA frente al daño causado por especies reactivas de oxígeno como son los radicales hidroxilo (Lopez-Gomollón *et al.*, 2009), se consideró interesante la determinación de ROS, concretamente de agua oxigenada, en la estirpe silvestre y en la cepa $\Delta furB$.

Los cultivos se crecieron en Frascos Roux de vidrio con agitación mediante burbujeo de aire y la determinación de ROS se realizó cuando éstos se encontraban en la fase exponencial tardía de crecimiento, que es la fase en la que presumiblemente va a haber más ROS dentro de la célula.

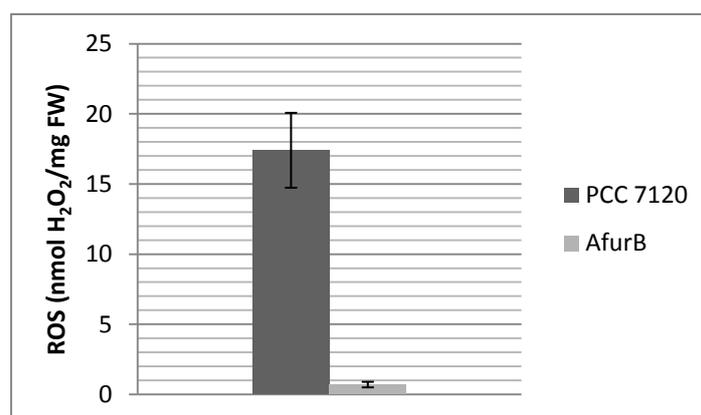


Figura 16. Contenido en ROS (H₂O₂). En gris oscuro, contenido en *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en gris claro, en la cepa $\Delta furB$. Los valores son la media de tres experimentos y la desviación estándar viene representada por las líneas verticales. Están expresados como nmol H₂O₂/mg de peso fresco.

En la figura 16 se aprecia que la estirpe silvestre tiene un contenido en agua oxigenada de $17,41 \pm 2,67$ nmol H_2O_2 /mg FW, mientras que la cepa $\Delta furB$ tiene un contenido 20 veces menor, concretamente de $0,70 \pm 0,20$ nmol/mg FW.

4.1.5. Determinación de la actividad catalasa

Debido a las diferencias observadas en el contenido de agua oxigenada entre *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Anabaena* $\Delta furB$, se decidió llevar a cabo la determinación de la actividad catalasa, enzima encargada de descomponer el agua oxigenada, en ambas cepas.

La determinación se efectuó en cultivos en la fase exponencial tardía crecidos en Frascos Roux de vidrio con agitación mediante burbujeo de aire.

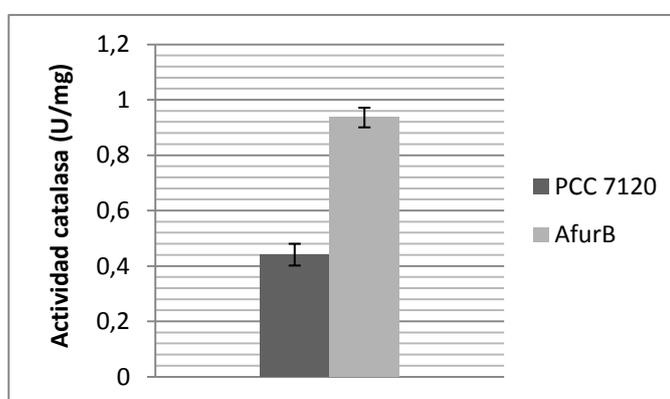


Figura 17. Actividad catalasa. En gris oscuro, la actividad catalasa en *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en gris claro, en la estirpe $\Delta furB$. Los valores son la media de tres experimentos y la desviación estándar viene representada por las líneas verticales. Están expresados como U/mg de proteínas totales.

Como se aprecia en la figura 17, la estirpe silvestre tiene una actividad catalasa de $0,44 \pm 0,04$ U/mg, mientras que la estirpe $\Delta furB$ tiene más del doble de esta actividad, concretamente de $0,94 \pm 0,04$ U/mg. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado anterior: la cepa silvestre tiene una actividad catalasa menor y, por lo tanto, mayor cantidad de agua oxigenada que cepa de delección de *furB*.

4.1.6. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Se decidió evaluar la actividad de otra enzima involucrada en la eliminación de ROS, la superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación de dos moléculas de superóxido.

De nuevo, la determinación se efectuó en cultivos en la fase exponencial tardía crecidos en Frascos Roux de vidrio con agitación mediante burbujeo de aire.

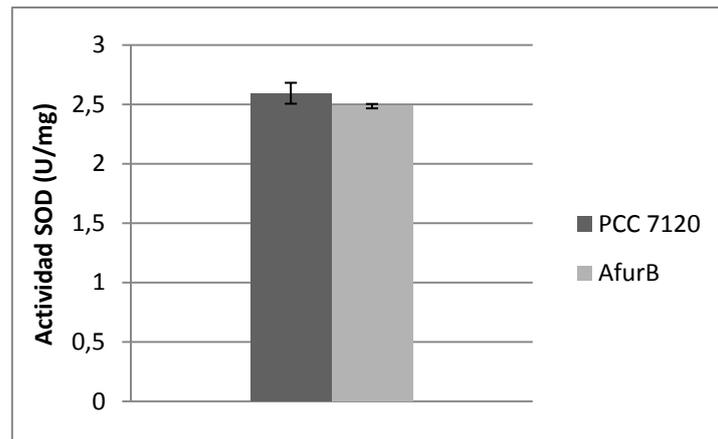


Figura 18. Actividad SOD. En gris oscuro, la actividad SOD en *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en gris claro, en la estirpe $\Delta furB$. Los valores son la media de dos experimentos y la desviación estándar viene representada por las líneas verticales. Están expresados como U/mg de proteínas totales.

En la figura 18 se aprecia que la actividad SOD en la estirpe silvestre es de $2,59 \pm 0,09$ U/mg, una actividad muy similar a la presente en la cepa $\Delta furB$: $2,49 \pm 0,20$ U/mg.

4.1.7. Determinación de la tasa fotosintética y respiratoria

La presencia de un menor porcentaje de ficobiliproteínas y clorofila *a* en el mutante de delección $\Delta furB$, nos llevó a pensar que tal vez la capacidad fotosintética de este mutante estuviera alterada con respecto a la estirpe silvestre. Por ello se procedió a medir la tasa de fotosíntesis de ambas cepas. Pero, puesto que las cianobacterias simultanean el proceso fotosintético con la respiración (figura 19), se midió la tasa fotosintética y también la tasa de respiración.

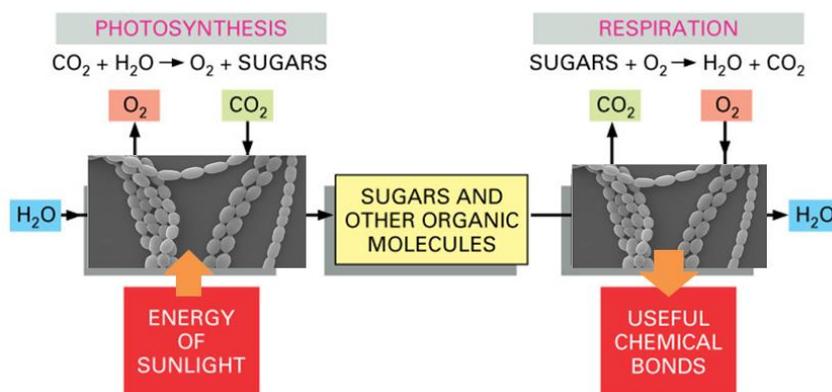


Figura 19. Esquema de la fotosíntesis y respiración en cianobacterias. Durante la fotosíntesis, el agua es oxidada dando lugar a oxígeno atmosférico. Los electrones son empleados para obtener poder reductor y sintetizar así moléculas orgánicas complejas a partir del CO_2 . En la respiración se consumen las moléculas orgánicas y el oxígeno, produciéndose CO_2 y agua. Adaptado de Essential Cell Biology, Garland Science.

Se emplearon cultivos en la fase exponencial, crecidos en Frascos Roux de vidrio con agitación mediante burbujeo de aire. Para la medición de la tasa fotosintética se

introdujo un mililitro de cultivo en la cámara de reacción del electrodo y se iluminó con una intensidad de luz saturante ($400 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$). Para la medición de la tasa de respiración se mantuvo la cámara en completa oscuridad, cubriéndola con papel de aluminio.

| Parámetro | PCC 7120 | $\Delta furB$ |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| Tasa fotosíntesis | $7,06 \pm 0,31$ | $4,94 \pm 0,01$ |
| Tasa respiración | $2,00 \pm 0,21$ | $1,20 \pm 0,18$ |
| Evolución total O_2 | $9,06 \pm 0,52$ | $6,14 \pm 0,18$ |

Tabla 11. Tasas fotosintética y respiratoria. Se muestran los resultados para *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Anabaena* $\Delta furB$. La evolución total de oxígeno se ha calculado como la suma de las tasas fotosintética y respiratoria. Los valores son la media de dos determinaciones \pm desviación estándar. Se expresan en $\text{nmol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Chl } a^{-1}$.

De los datos mostrados en la tabla 11 se obtiene que el mutante $\Delta furB$ tiene una tasa fotosintética un 30% menor que la estirpe silvestre y una tasa respiratoria un 40% menor. Esto hace que tenga una menor evolución total de O_2 a lo largo del tiempo.

4.2. Obtención de una estirpe de sobreexpresión de FurB en *Anabaena* sp.

La estirpe de *Anabaena* sp. sobreexpresando el gen *furB* se obtuvo mediante conjugación triparental, introduciendo en *Anabaena* sp. PCC 7120 el vector replicativo pAM2770::*furB*. A continuación, se realizaron cultivos en medio BG-11 líquido de algunos de los clones exconjugantes, se indujo la transcripción y se seleccionó el clon de mayor sobreexpresión mediante Western blot empleando anticuerpos anti-FurB.

4.2.1. Clonaje de *furB* en el vector lanzadera pAM2770

La mezcla de ligación del gen *furB* y el vector pAM2770 se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α . Se verificaron por PCR amplificando el gen *furB*, las colonias conteniendo el plásmido pAM2770::*furB*. Asimismo, la correcta inserción del gen *furB* en el vector pAM2770 se comprobó mediante una PCR adicional, empleando los mismos oligonucleótidos que se usarían luego en la secuenciación (ver tabla 5 en el apartado de materiales y métodos).

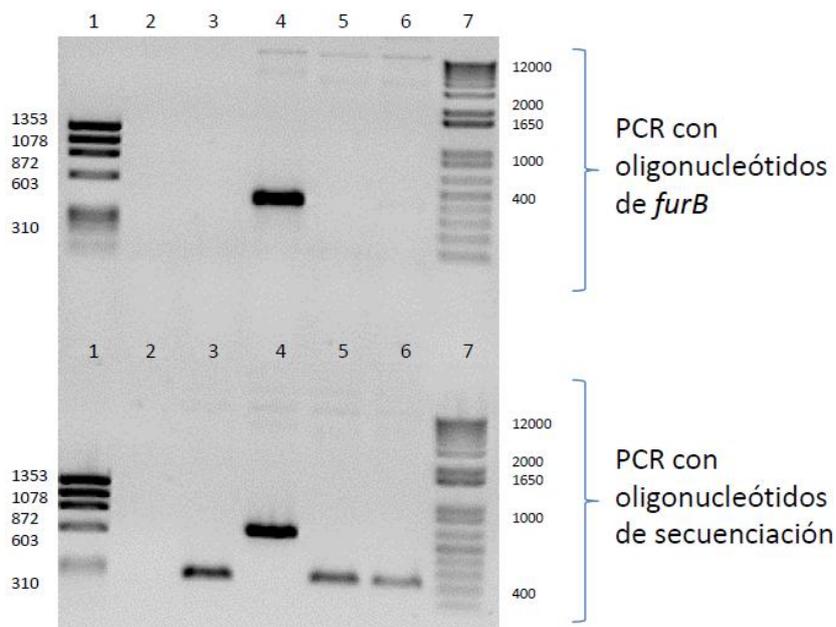


Figura 20. Clonaje de *furB* en pAM2770. Se muestra un gel de electroforesis con dos líneas de pocillos. Arriba: resultado de la PCR con oligonucleótidos de *furB*. Abajo: resultado de la PCR con oligonucleótidos de secuenciación. El contenido de los carriles es el siguiente: 1 (marcador ϕ X174/HaeIII), 2 (control negativo de PCR), 3 (vector pAM2770 vacío), 4 (DNA extraído de la colonia 4), 5 (DNA extraído de la colonia 5), 6 (DNA extraído de la colonia 6), 7 (marcador 1Kb DNA Ladder).

Según se observa en la figura 20, la colonia 4 era la que contenía el plásmido pAM2770::*furB* porque se obtuvo un producto de ~400 pb al amplificar con los oligonucleótidos de *furB* (399 pb) y un producto de ~600 pb al amplificar con los oligonucleótidos de secuenciación. Las demás colonias analizadas contenían el vector pAM2770 vacío, por eso no había amplificación con los oligonucleótidos de *furB* pero sí con los de secuenciación, correspondiéndose el producto con el que se obtiene en el vector vacío (carril 3 del gel inferior). Adicionalmente, se verificó la correcta orientación del gen dentro del vector mediante secuenciación.

Por lo tanto, se aisló el plásmido pAM2770::*furB* de la colonia 4 y se empleó para transformar células competentes de *E. coli* CPB1893 y continuar así con el proceso conjugativo.

4.2.2. Conjugación triparental en *Anabaena* sp.

Una vez que el filtro con la mezcla de conjugación (*E. coli* CPB1893, *E. coli* ED8654 y *Anabaena* sp. PCC 7120) fue colocado en una placa de medio selectivo (BG-11/Nm), transcurrieron aproximadamente 20 días hasta observar la muerte de la mayor parte de las cianobacterias; aquellas que no habían adquirido el plásmido pAM2770::*furB* (figura 21B). Aproximadamente 30 días después de eliminar el fondo de cianobacterias no exconjugantes, se observó la aparición de pequeñas colonias aisladas de *Anabaena*, las cuales se dejaron crecer sobre el filtro hasta alcanzar el tamaño que se muestra en la figura 21C.

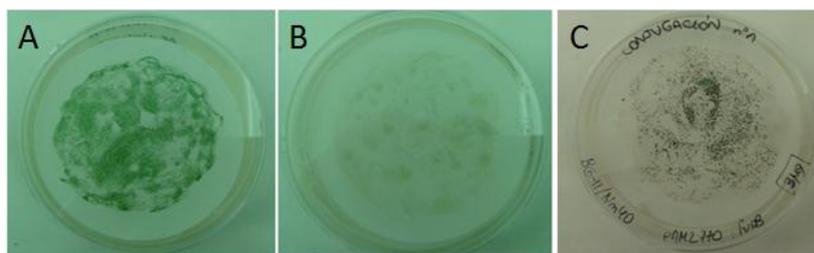


Figura 21. Etapas de la conjugación. Se muestra el filtro de conjugación colocado sobre la placa de medio sólido. A) Mezcla de conjugación en el día 0 del proceso; el color verde se debe a la presencia de multitud de células vivas de *Anabaena*. B) Mezcla de conjugación en el día 20; el color amarillo se debe a la muerte de la mayoría de las células de *Anabaena*. C) Mezcla en el día 50 de la conjugación; se observan colonias aisladas de la cianobacteria.

A continuación, algunas de las colonias obtenidas en la conjugación se sembraron en placas de BG-11/Nm para obtener mayor cantidad de biomasa de cada clon exconjugante (figura 22).

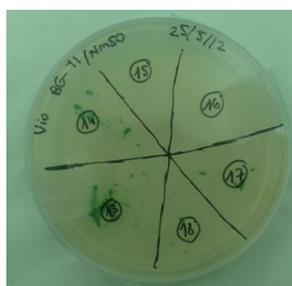


Figura 22. Siembra de los clones tras la conjugación. Se observa crecimiento de algunas colonias (13, 14, 17, 18), pero no de otras (15, 16).

4.2.3. Selección del clon con mayor sobreexpresión de FurB

Con el fin de identificar el clon con mayor sobreexpresión de FurB, algunas de las colonias crecidas anteriormente (13, 17 y 18) se inocularon en medio líquido BG-11/Nm empleando erlenmeyers de 250 ml y se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica a 750 nm de aproximadamente 0.3. En ese momento, se indujo la expresión de *furB* con CuSO_4 0'4 μM estéril durante 72 horas (Buikema and Haselkorn, 2001). Las células se colectaron por centrifugación, se sonicaron y se cargaron 6'5 μg de proteínas totales de cada uno de los cultivos en un gel SDS-PAGE al 17%. Finalmente, se analizó el nivel de expresión de FurB mediante Western Blot empleando anticuerpos anti-FurB. Como controles en el Western blot se incluyeron: 6'5 μg de extracto proteico de *Anabaena* sp. PCC 7120 para analizar el nivel de expresión habitual de FurB y 6'5 μg de extracto proteico de *Anabaena* $\Delta furB$ para identificar correctamente las bandas obtenidas. Además, para garantizar que la cantidad de extracto cargada era efectivamente la misma en todos los carriles, se realizó simultáneamente otro gel de SDS-PAGE al 17% con 6'5 μg de proteínas totales y se tiñó con azul Coomassie.

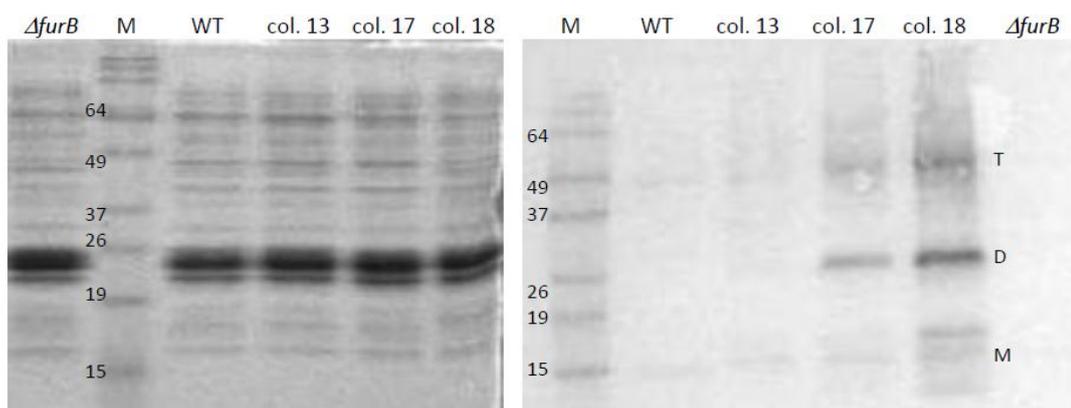


Figura 23. Tinción con Coomasie (izquierda) y Western blot con α FurB (derecha) de los extractos proteicos de las colonias de conjugación. De izquierda a derecha en el WB los carriles corresponden a: extracto proteico de *Anabaena* sp. PCC 7120, extracto proteico de la colonia 13, extracto proteico de la colonia 17, extracto proteico de la colonia 18 y extracto proteico *Anabaena* Δ *furB*. Aparecen señaladas las bandas correspondientes al monómero de proteína (M), dímero (D) y trímero (T). Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

En el gel teñido con Coomasie (figura 23 izquierda) se observa como efectivamente la cantidad de extracto proteico empleada fue la misma en todas las muestras, porque todos los carriles presentan una intensidad semejante de las diferentes bandas. Las bandas más intensas, localizadas entre los 19-26 kDa, corresponden a las ficobiliproteínas, que son las proteínas más abundantes en *Anabaena* sp. En el Western blot (figura 23 derecha) se aprecia que las colonias 17 y 18 son las que presentan una mayor expresión de FurB. La proteína se encuentra como monómero (15kDa) y como trímero (45 kDa), pero la mayor parte está en forma dimérica (30 kDa). Además, las bandas observadas en el Western blot corresponden inequívocamente a la proteína FurB, ya que no aparecen en el carril del mutante de delección. Por lo tanto y, a la vista de los resultados, se seleccionó el clon 18 como el de mayor sobreexpresión de FurB y pasó a denominarse *Anabaena* sp. VCS2770FurB.

Adicionalmente, para visualizar el nivel de expresión de FurA en los clones exconjugantes anteriores, se llevó a cabo un Western blot de los mismos extractos proteicos, pero esta vez empleando anticuerpos anti-FurA diluidos 1:5000 en TBST.

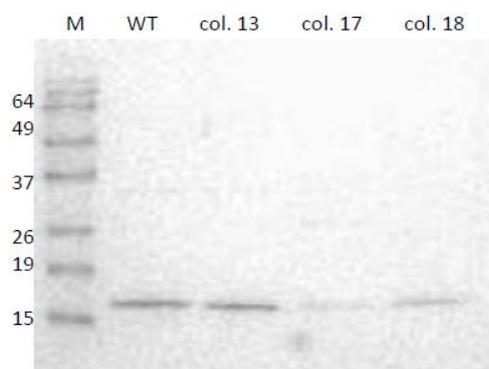


Figura 24. Western blot con α FurA de los extractos proteicos de las colonias de conjugación. De izquierda a derecha los carriles corresponden a: extracto proteico de *Anabaena* sp. PCC 7120,

extracto proteico de la colonia 13, extracto proteico de la colonia 17 y extracto proteico de la colonia 18. En todos los casos se cargaron 6'5 μg de proteínas totales. Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

En la figura 24 se aprecia como todos los extractos presentan la banda correspondiente a la forma monómerica de FurA (17 KDa) y como, además, las colonias en las que había mayor expresión de FurB (colonias 17 y 18), tienen una menor expresión de FurA.

4.3. Expresión de FurB bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés en *Anabaena* sp. PCC 7120

4.3.1. Expresión de FurB bajo estrés oxidativo

Estudios previos del grupo demostraron que, *in vitro* y bajo condiciones de estrés oxidativo, FurB se une al DNA de forma inespecífica y lo protege del daño provocado por radicales hidroxilo y DNAsal (Lopez-Gomollón *et al.*, 2009). Por ello, se decidió analizar en este trabajo el nivel de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo causado por agua oxigenada.

En tubos Falcon con burbujeo de aire, se prepararon cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la fase exponencial de crecimiento y con diferentes concentraciones finales de agua oxigenada: 0, 0'5 y 1 mM. A las 0, 6 y 24 horas de añadir el agua oxigenada, se tomaron muestras de los cultivos, que se concentraron y sonicaron. Tras determinar la concentración proteica mediante el método del BCA, se cargaron 30 μg de proteínas totales en un gel de SDS-PAGE al 17% para luego realizar un Western blot empleando anticuerpos anti-FurB (figura 25).

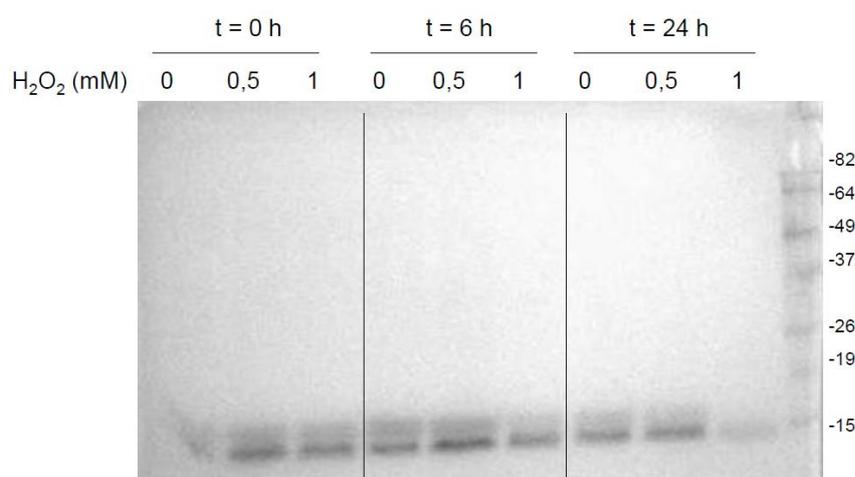


Figura 25. Expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo estrés oxidativo. En todos los carriles se cargaron 30 μg de extracto proteico. La cantidad de agua oxigenada del cultivo se muestra en la imagen, así como el tiempo al cual se tomó cada muestra. Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

En todos los carriles de la figura 25 se aprecian dos bandas de proteína FurB. Esto se suele observar también en otras proteínas de la familia Fur y posiblemente se deba a la existencia de poblaciones proteicas con diferentes estados redox de las cisteínas (recordar que FurB posee 5 cisteínas). En cuanto a la intensidad de las bandas o, lo que es equivalente, la expresión de FurB, se observa un ligero aumento en la expresión al cabo de 6 horas con agua oxigenada a una concentración 0'5 mM. Por el contrario, hay un notable descenso en la expresión al cabo de 24 horas con agua oxigenada 1 mM.

4.3.2. Expresión de FurB bajo diferentes condiciones de iluminación

Puesto que se observaron diferencias notables en los niveles de algunos pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficobiliproteínas) entre la estirpe silvestre y la cepa de delección de FurB, se decidió analizar el nivel de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones de iluminación.

En tubos Falcon con burbujeo de aire, se prepararon cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la fase exponencial de crecimiento y bajo diferentes condiciones de iluminación: estándar ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), baja ($10 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y alta ($500 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$). A las 0, 6 y 24 horas de iniciar los cultivos, se tomaron muestras de cada uno de ellos, que se concentraron y sonicaron. Finalmente, se cargaron $30 \mu\text{g}$ de proteínas totales en un gel de SDS-PAGE al 17% para luego realizar un Western blot empleando anticuerpos anti-FurB (figura 26).

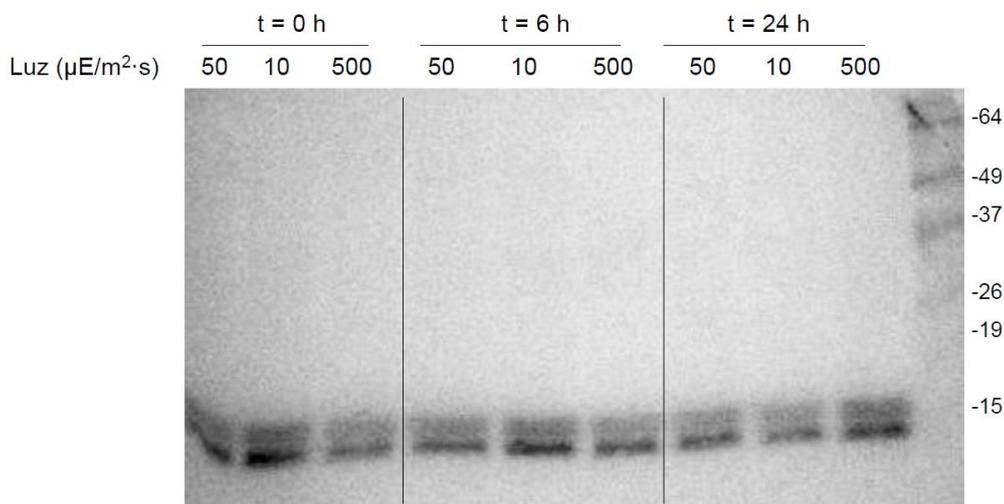


Figura 26. Expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones de iluminación. En todos los carriles se cargaron $30 \mu\text{g}$ de extracto proteico. La intensidad lumínica empleada se muestra en la imagen, así como el tiempo al cual se tomó cada muestra. Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

En la figura 26, que muestra el nivel de expresión de FurB en función de las diferentes condiciones de iluminación y a lo largo del tiempo, podría señalarse un ligero descenso en la expresión de FurB a lo largo del tiempo en las condiciones de baja iluminación ($10 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y un pequeño aumento en las condiciones de alta iluminación ($500 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) a lo largo del tiempo.

4.3.3. Expresión de FurB en función de la cantidad de zinc del medio

Ya que se ha propuesto que FurB regula la homeostasis del zinc en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Napolitano *et al.*), se decidió evaluar la cantidad de FurB presente en cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 con diferentes cantidades de zinc disponible.

En erlenmeyers de 250 ml con agitación constante en un incubador orbital, se prepararon cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la fase exponencial de crecimiento y en diferentes condiciones de disponibilidad de zinc: 0'77 μ M de zinc disponible (cultivo realizado en medio BG-11 completo), trazas de zinc disponibles (cultivo realizado en medio BG-11 sin zinc, conteniendo únicamente el que impurifica algunos de los reactivos) y nada de zinc disponible (cultivo realizado en medio BG-11 completo tratado durante 12 horas con TPEN, que es un quelante específico de zinc). Los distintos cultivos fueron concentrados y se cargaron 30 μ g de proteínas totales en un gel de SDS-PAGE al 17% para luego realizar un Western blot con anticuerpos anti-FurB (figura 27).

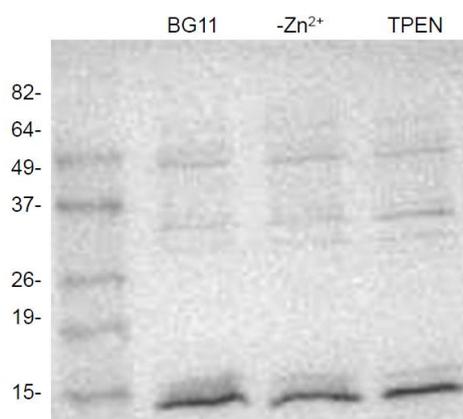


Figura 27. Expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes concentraciones de zinc disponible. En todos los carriles se cargaron 30 μ g de extracto proteico. El primer carril corresponde al cultivo realizado en medio BG-11 completo. El segundo carril, al cultivo realizado en medio BG-11 sin zinc. El tercer carril corresponde al cultivo realizado en medio BG-11 tratado durante 12 horas con TPEN. Las bandas del marcador de peso molecular se indican en kDa.

En todos los carriles de la figura 27 se observa una banda de ~15 kDa corresponde al monómero de FurB. Las bandas superiores podrían corresponder a las formas dimérica (30kDa) y trimérica (45 kDa). No obstante, no se observan diferencias apreciables en la expresión de FurB en las diferentes situaciones de disponibilidad de zinc ensayadas.

4.4. Afinidad *in vitro* de FurB a distintos promotores

Se decidió estudiar si existe una regulación directa por parte de FurB de algunos genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo, como el de la superóxido dismutasa dependiente de hierro o el de la glutathion reductasa. Para ello, se analizó la afinidad *in vitro* de FurB a los promotores de dichos genes mediante ensayos EMSA.

Los ensayos se realizaron con proteína FurB con cola de histidinas, ya que estudios anteriores en el laboratorio demostraron que ésta no afectaba a la unión de la proteína con el DNA. En primer lugar, la actividad de la proteína se demostró mediante un ensayo EMSA con el promotor del gen *fhuF* de *E. coli* y empleando como inespecífico el promotor del gen *nifJ* de *Anabaena* (figura 28). Además, como control positivo del ensayo se incluyó la proteína FurA junto con su promotor, al cual se une en presencia de manganeso y DTT (Hernández *et al.*, 2006a). En el caso de FurA, se usó como inespecífico el promotor *Palr0532*.

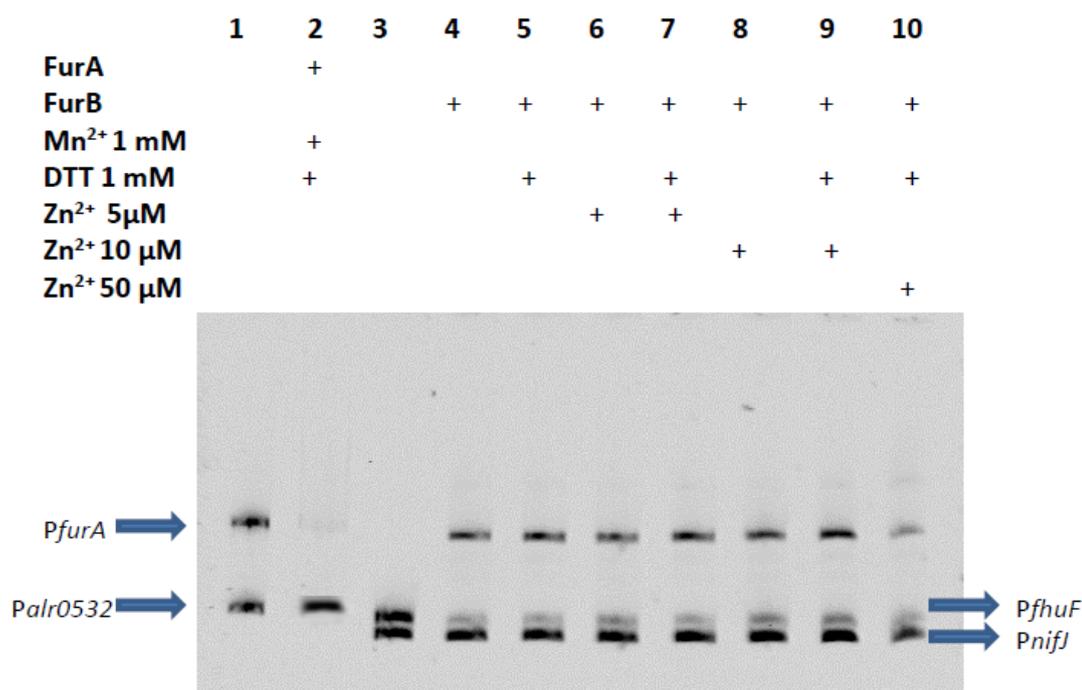


Figura 28. EMSA con el promotor de la proteína FhuF. Los carriles 1 y 2 contienen *PfurA* y *Palr0532*, además de los componentes arriba indicados. Los carriles 2-8 contienen *Pfhuf* y *Pnifj*.

En la figura 28 se observa que la proteína FurB empleada es activa en las condiciones de ensayo, pues produce una disminución en la movilidad electroforética del promotor de *Pfhuf* al unirse a él (carriles 4-10) y da lugar a un complejo bien definido. Lo que no se aprecia es que exista una diferente afinidad en función de la cantidad de zinc o de poder reductor presentes en el medio.

Una vez comprobado que la proteína era activa, se realizaron ensayos EMSA con promotores de genes de *Anabaena*: el promotor de la Fe-SOD (*PsodB*) y el de la glutatión reductasa (*Pgor*). En todos los casos se empleó como inespecífico el promotor del gen *nifJ*.

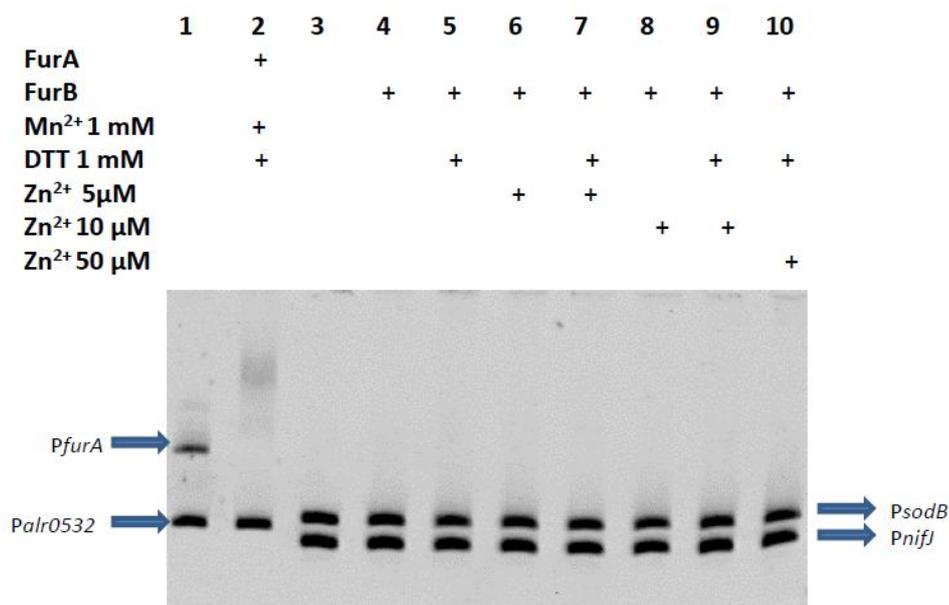


Figura 29. EMSA con el promotor de la Fe-SOD. Los carriles 1 y 2 contienen *PfurA* y *Palr0532*, además de los componentes arriba indicados. Los carriles 2-8 contienen *PsodB* y *Pnifj*.

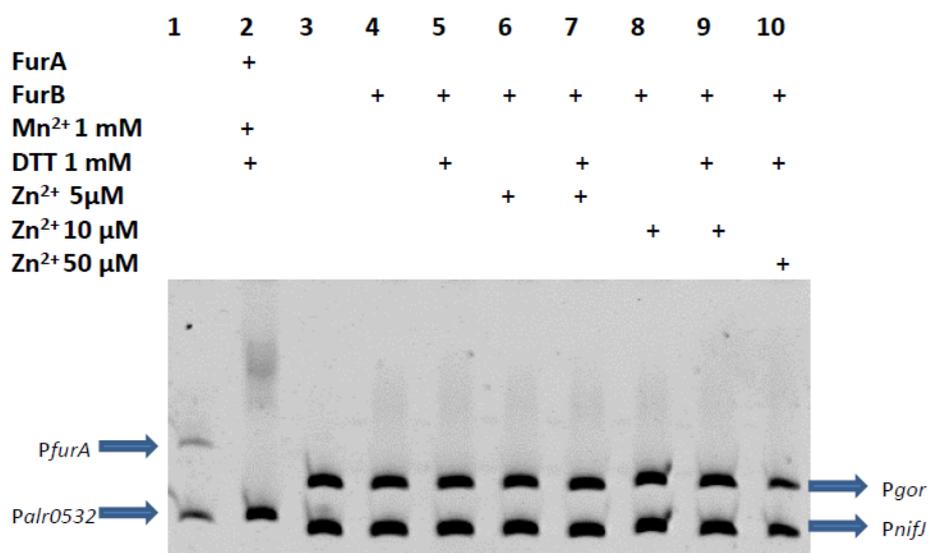


Figura 30. EMSA con el promotor de la glutation reductasa. Los carriles 1 y 2 contienen *PfurA* y *Palr0532*, además de los componentes arriba indicados. Los carriles 2-8 contienen *Pgor* y *Pnifj*.

En las figuras 29 y 30 se aprecia que no hay interacción de FurB ni con el promotor de la Fe-SOD ni con el de la glutation reductasa. Sí que la había en cambio con el promotor del gen *fhuF* de *E. coli*, que codifica la proteína FhuF, encargada de reducir el Fe³⁺ de la ferrioxamina B (Matzanke *et al.*, 2004).

5. Discusión

5. Discusión

Estudios realizados en nuestro grupo de investigación mostraron que, *in vitro* y bajo condiciones de estrés oxidativo, FurB era capaz de unirse al DNA de forma inespecífica para protegerlo del daño provocado por DNAsal y radicales hidroxilo (López-Gomollón *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios más recientes describen a la proteína FurB como un represor clásico que regula la transcripción de sus genes diana por medio de la unión específica a cajas Fur localizadas en sus promotores (Napolitano *et al.*). Todas estas evidencias llevaron a proponer una función dual de la proteína FurB: a bajas concentraciones actuaría como un miembro de la familia Fur, regulando la transcripción de múltiples genes mediante su unión a cajas Fur, mientras que a concentraciones saturantes podría actuar protegiendo al DNA mediante su unión inespecífica al mismo.

También se observó que la sobreexpresión de FurB en *E. coli* aumentaba la supervivencia de las células cuando éstas eran sometidas a tratamiento con agua oxigenada y metil viológeno, un agente que da lugar a la formación de aniones superóxido (López-Gomollón *et al.*, 2009). Esto podría sentar las bases para posibles aplicaciones biotecnológicas de la proteína FurB, ya que podría considerarse la generación de plantas transgénicas sobreexpresando FurB con el fin de obtener una mayor resistencia frente a estrés oxidativo.

Así, se consideró interesante profundizar en el estudio de la proteína FurB y, para tener un mayor conocimiento de los procesos biológicos en los que interviene esta proteína en *Anabaena* sp. PCC 7120, se siguieron las estrategias ya mencionadas a lo largo de este trabajo.

5.1. Caracterización fenotípica de *Anabaena* $\Delta furB$

Los mutantes de delección de factores de transcripción son importantes herramientas para identificar los regulones de los mismos. En el caso de *Anabaena* $\Delta furB$, este mutante sirvió para demostrar que FurB es un factor de transcripción que actúa como un represor clásico, ya que el mutante presenta mayores niveles de transcripción de los genes a los que regula FurB con respecto a la estirpe silvestre (Napolitano *et al.*). En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica de este mutante de delección con el objetivo de aportar nuevos datos para dilucidar los procesos biológicos en los que interviene la proteína FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120.

A lo largo de estos años, se ha intentado en diferentes laboratorios delecionar el gen *furA* de *Anabaena*, sin obtenerse resultados satisfactorios. Esto puede deberse a que se trate de un gen esencial para la supervivencia de la cianobacteria puesto que, además de mantener la homeostasis del hierro, es un regulador global de la transcripción (González *et al.*, 2010). Sin embargo, sí que ha sido posible obtener el mutante de delección de *furB* ya mencionado, por lo cual podría deducirse que, bajo las condiciones estándar de cultivo, FurB no es una proteína esencial en *Anabaena* sp. PCC 7120. No obstante, sí que hay que destacar que el mutante de delección $\Delta furB$ presenta una menor velocidad de crecimiento que la estirpe silvestre (0,05 días⁻¹ frente a 0,08 días⁻¹) por lo que, aunque FurB no resulte esencial, sí que contribuye directa o indirectamente al crecimiento de la cianobacteria.

En cuanto a la morfología del mutante $\Delta furB$, no se aprecian cambios significativos en la longitud de las cadenas ni en el tamaño de las células. Tampoco hay cambios relevantes en la disposición de las membranas tilacoidales ni de los gránulos internos. Sin embargo, resulta interesante la menor superficie de contacto existente entre las células del mutante, que presentan uniones (septos) más pequeñas. Esto podría deberse a una alteración en la regulación de genes que controlan la morfología de la célula. Por ejemplo, se ha demostrado que FurA se une al operon *mreBCD*, que codifica para la actina MreB, la cual tiene un papel crítico en la determinación de la forma de las células de *Anabaena* (González *et al.*, 2010). Así, los resultados obtenidos podrían sugerir un papel directo o indirecto de FurB en la regulación transcripcional de este operon. Además, estudios realizados por otros autores, describen a FurB como regulador de varios genes de subunidades de sistemas ABC de transporte localizados en la membrana plasmática y también de receptores dependientes de TonB localizados en la membrana externa (Napolitano *et al.*). De esta manera, al no expresarse FurB en el mutante $\Delta furB$, habría una desregulación de los genes de dichas proteínas, con la consecuente alteración de las membranas celulares.

La menor superficie de contacto existente entre las células podría ser la causa de la fragilidad celular observada en el mutante $\Delta furB$, que quedó patente al producirse la liberación de pigmentos fotosintéticos al cabo de 48 horas en ausencia de agitación.

La autofluorescencia del mutante $\Delta furB$ tampoco pareció estar alterada. Hay que recordar que esta propiedad es debida a la presencia de una ficobiliproteína, la ficocianina. Por lo tanto, dado que el mutante presentó un porcentaje de ficobiliproteínas sólo ligeramente inferior al de la estirpe silvestre, tampoco eran de esperar cambios significativos en la fluorescencia de las células.

Resulta destacable la apreciable disminución de la actividad fotosintética observada en el mutante $\Delta furB$ en comparación con la estirpe silvestre ($4,94 \pm 0,01$ frente a $7,06 \pm 0,31$ nmolO₂·ml⁻¹·min⁻¹·mg Chl *a*⁻¹). Esta afectación podría deberse en parte a la gran

disminución del contenido de clorofila *a* y algo menor de ficobiliproteínas en el mutante. Sin embargo, no podemos descartar la influencia directa o indirecta de FurB en la regulación transcripcional de los genes involucrados en la fotosíntesis.

Anabaena sp. dispone de múltiples enzimas detoxificantes como catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas y glutatión reductasa (figura 30).

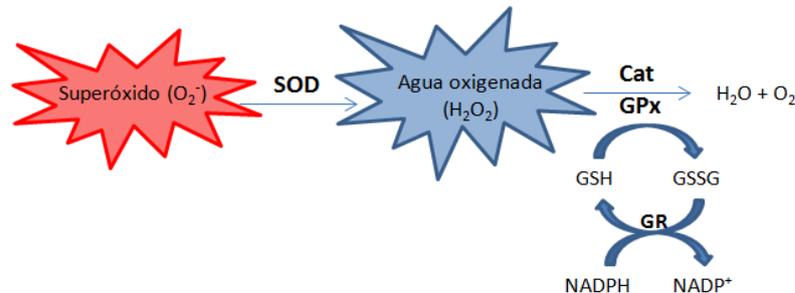


Figura 30. Enzimas antioxidantes. Las enzimas se muestran en negrita. SOD: superóxido dismutasa, Cat: catalasa, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

Además de regulador de la homeostasis del zinc (Napolitano *et al.*), estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado el papel relevante de FurB como proteína protectora del DNA frente a daño oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009). En este trabajo se ha observado un incremento considerable en la actividad catalasa del mutante $\Delta furB$, llegando a duplicarse lo observado en la estirpe silvestre ($0,94 \pm 0,04$ U/mg frente a $0,44 \pm 0,04$ U/mg). Estos datos concuerdan con los obtenidos en la determinación del agua oxigenada en el mutante: al tener una mayor actividad catalasa, presenta un contenido 20 veces menor de agua oxigenada. Pero, debido a que el gen catalasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 todavía no ha sido identificado, no se ha podido comprobar mediante ensayos EMSA si esta alteración en la actividad catalasa se debe a una regulación directa del promotor por la proteína FurB, que está ausente en el mutante, o si es un efecto indirecto. A la vista de los resultados, resulta lógico especular que la ausencia de FurB como proteína protectora en el mutante $\Delta furB$ podría conllevar a la inducción de enzimas antioxidantes, como la catalasa.

Sin embargo, no se han encontrado cambios apreciables en la actividad superóxido dismutasa del mutante, lo cual coincide además con los ensayos EMSA realizados con el promotor de la Fe-SOD, en los cuales no se veía interacción de la proteína con el promotor. Tampoco se ha observado que haya una regulación directa del promotor de la glutatión reductasa por parte de FurB.

5.2. Obtención de una estirpe de sobreexpresión de FurB en *Anabaena* sp.

Aunque ya se ha citado la importancia de los mutantes de delección para el estudio de los regulones de factores de transcripción, también es notable la importancia de los mutantes de sobreexpresión. La sobreexpresión de reguladores transcripcionales ha sido empleada en *Anabaena* sp. (Buikema and Haselkorn, 2001; González *et al.*, 2010) y en otras bacterias (Marr *et al.*, 2006) como herramienta para determinar los mecanismos de regulación génica. Así, aunque para este trabajo ya se disponía del mutante de *Anabaena* sp. con el gen *furB* delecionado, se consideró interesante obtener además un mutante sobreexpresando la proteína FurB.

Debido a la gruesa pared celular presente en *Anabaena*, se decidió recurrir a la conjugación triparental como método más eficaz para introducir el plásmido de sobreexpresión en la cianobacteria (Elhai *et al.*, 1997). Esta técnica se llevó a cabo de forma satisfactoria, obteniéndose clones exconjugantes y demostrando que es posible sobreexpresar la proteína FurB sin que la cianobacteria sufra alteraciones importantes que impidan su desarrollo.

Además, es destacable que las colonias exconjugantes con un mayor nivel de expresión de FurB, presentaron una expresión de FurA menor. Esto podría ser debido a la existencia de un mecanismo de compensación entre ambas proteínas. Aunque las proteínas FurA y FurB comparten una baja homología en sus secuencias y al parecer cumplen diferentes funciones en la célula (Hernández *et al.*, 2007; López-Gomollón *et al.*, 2007; López-Gomollón *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010; Napolitano *et al.*), se ha observado que tanto FurA como FurB confieren resistencia frente a estrés oxidativo cuando son sobreexpresadas en *E. coli* (López-Gomollón *et al.*, 2009). En tal sentido, la sobreexpresión de FurB podría ejercer un efecto compensatorio para ciertas funciones de FurA.

La estirpe de sobreexpresión de FurB obtenida será una importante herramienta para futuros trabajos, ya que la caracterización fenotípica de la misma nos permitirá corroborar los datos obtenidos en el mutante de delección $\Delta furB$.

5.3. Expresión de FurB bajo diferentes condiciones nutricionales y de estrés en *Anabaena* sp. PCC 7120

A pesar de que el mutante $\Delta furB$ presentó el doble de actividad catalasa que la estirpe silvestre, sugiriendo una relación directa o indirecta FurB-catalasa, los estudios de expresión de FurB llevados a cabo en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes situaciones de estrés oxidativo causado por agua oxigenada (0'5 mM y 1 mM), sólo

mostraron pequeñas diferencias en el nivel de expresión de FurB tras la exposición al agua oxigenada. Se observó un ligero aumento en la expresión al cabo de 6 horas con agua oxigenada a una concentración de 0'5 mM, lo cual concuerda con la suposición de que, a elevadas concentraciones, FurB actúa como protector del DNA frente al estrés oxidativo (Lopez-Gomollón *et al.*, 2009). Por el contrario, se apreció un descenso en la expresión de FurB al cabo de 24 horas con agua oxigenada 1 mM, que podría ser debido a una destrucción de la proteína a causa del excesivo estrés oxidativo al cual está sometida (Cabiscol *et al.*, 2000).

En cuanto a los ensayos de expresión de FurB realizados sobre la estirpe silvestre bajo diferentes condiciones de iluminación (50, 10 y 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), se apreció una ligera disminución en la expresión de la proteína a lo largo del tiempo en condiciones de baja iluminación y, por el contrario, un ligero aumento de la expresión en condiciones de iluminación alta. Esto podría deberse a que, en condiciones de baja iluminación, la tasa fotosintética es menor y, como consecuencia, hay una menor generación de especies reactivas de oxígeno. En estas condiciones no serían necesarias cantidades elevadas de proteína FurB para proteger al DNA del daño provocado por las especies reactivas. En cambio, en condiciones de iluminación alta, la tasa fotosintética aumenta y hay mayor producción de especies reactivas, por lo que la célula requeriría niveles mayores de FurB.

Aunque se ha propuesto que FurB es un regulador de la captación de zinc al interior de la célula (Napolitano *et al.*), en los estudios de expresión llevados a cabo en la estirpe silvestre bajo diferentes situaciones de disponibilidad de zinc, no se observaron diferencias en el nivel de expresión de la proteína. Esto podría implicar que tal vez una cantidad basal de FurB es suficiente para reprimir los genes encargados del transporte de zinc. De hecho, Napolitano *et al.* han observado que la unión de FurB a los promotores de estos genes es de alta afinidad, con una constante de $2'5\cdot 10^{-9}\text{M}$, por lo que bastaría una cantidad muy pequeña de FurB para reprimirlos.

En futuros estudios se profundizará en la influencia del ambiente en la regulación de la expresión de FurB y se estudiará la influencia de otros parámetros ambientales mediante técnicas analíticas más sensibles como la RT-PCR. Asimismo, como continuación de este estudio, pensamos que resultará de gran relevancia la caracterización fenotípica de la estirpe de *Anabaena* sp. sobreexpresando la proteína FurB.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. Se ha caracterizado el mutante de *Anabaena* sp. con el gen *furB* deletado, obteniéndose lo siguiente:
 - 1.1. Tiene una velocidad de crecimiento menor y una tasa de duplicación mayor que la estirpe silvestre por lo que, aunque FurB no resulta esencial, su delección sí que afecta al crecimiento de la cianobacteria.
 - 1.2. Aunque no presenta modificaciones en el tamaño de las células, longitud de las cadenas, autofluorescencia de las células ni disposición de las membranas tilacoidales, sí que presenta una menor superficie de contacto entre las células y una mayor fragilidad celular que la estirpe silvestre. Esto podría deberse a una alteración en la expresión de genes que controlan la morfología de la célula o de genes de proteínas que forman parte de la membrana plasmática y de la membrana externa y que estarían regulados por FurB.
 - 1.3. Presenta un contenido apreciablemente menor de algunos pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a* y ligeramente menor de otros como las ficobiliproteínas, lo cual podría ser una de las causas de la menor tasa fotosintética que presenta este mutante, que es un 30% de la tasa fotosintética de la estirpe silvestre.
 - 1.4. Presenta una actividad catalasa mayor que la estirpe silvestre, lo cual concuerda con su menor contenido en agua oxigenada. Esto podría significar que la ausencia de FurB como proteína protectora en el mutante $\Delta furB$ implica la inducción de enzimas antioxidantes como la catalasa.
 - 1.5. No presenta alteraciones apreciables en la actividad superóxido dismutasa, ni tampoco se observa que haya una regulación directa del promotor de la Fe-SOD por parte de FurB. Tampoco se ha observado interacción directa de FurB con el promotor de otra enzima involucrada en el control del estrés oxidativo, la glutatión reductasa.
2. Se ha obtenido de forma satisfactoria el mutante de *Anabaena* sp. sobreexpresando la proteína FurB, al cual se ha denominado *Anabaena* sp. VCS2770FurB. El aumento en la expresión de FurB está ligado a una disminución en la expresión de FurA, lo cual podría sugerir que FurB ejercería un efecto compensatorio para ciertas funciones de FurA.

3. Los ensayos de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 en diferentes condiciones de estrés oxidativo causado por agua oxigenada sugieren que la expresión se induce bajo condiciones moderadas de estrés, pero que la proteína es destruida cuando el estrés es más pronunciado.
4. Los ensayos de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones de iluminación muestran que la expresión de la proteína desciende ligeramente a lo largo del tiempo en condiciones de baja iluminación y, por el contrario, aumenta en condiciones de iluminación alta. Esto concuerda con la hipótesis de que FurB actuaría en la célula como protector frente al daño oxidativo.
5. Los ensayos de expresión de FurB en *Anabaena* sp. PCC 7120 bajo diferentes condiciones de disponibilidad de zinc muestran que la expresión de la proteína no varía en las condiciones ensayadas. Esto se debe posiblemente a que la alta afinidad de FurB por los promotores a regular hace que sólo sea necesaria una cantidad basal de proteína para llevar a cabo su función represora.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

1. Adams, D.G. and P.S. Duggan, *Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria*. New Phytologist, 1999. **144**: p. 3-33.
2. Adams, D.G. and P.S. Duggan, *Cyanobacteria-bryophyte symbioses*. J Exp Bot, 2008. **59**(5): p. 1047-58.
3. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodríguez-Quiñones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiology Reviews, 2003. **27**: p. 215-237.
4. Araoz, R., J. Molgo, and N. Tandeau de Marsac, *Neurotoxic cyanobacterial toxins*. Toxicon. **56**(5): p. 813-28.
5. Beers, R.F., Jr. and I.W. Sizer, *A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*. J Biol Chem, 1952. **195**(1): p. 133-40.
6. Berman-Frank, I., P. Lundgren, and P. Falkowski, *Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria*. Res Microbiol, 2003. **154**(3): p. 157-64.
7. Buikema, W.J. and R. Haselkorn, *Expression of the Anabaena hetR gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2729-34.
8. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
9. Cai, Y.P. and C.P. Wolk, *Use of a conditionally lethal gene in Anabaena sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences*. J Bacteriol, 1990. **172**(6): p. 3138-45.
10. Campbell, E.L. and J.C. Meeks, *Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic Nostoc spp. in Response to the Presence of Anthoceros punctatus or Its Extracellular Products*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(1): p. 125-31.
11. Carr, N.G. and B.A. Whitton, *The biology of cyanobacteria*. Botanical monographs. Vol. 19. 1982: University of California Press. 677.
12. Cheng, Q., *Perspectives in biological nitrogen fixation research*. Journal of integrative plant biology, 2008. **50** (7): p. 784-796.
13. Cohen, Y., E. Padan, and M. Shilo, *Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium Oscillatoria limnetica*. J Bacteriol, 1975. **123**(3): p. 855-61.
14. Davies, B.H., *Carotenoids*, in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, T.W. Goodwin, Editor. 1976, Academic Press: New York. p. 38-165.
15. Elhai, J., et al., *Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of Anabaena sp. strain PCC 7120*. J Bacteriol, 1997. **179**(6): p. 1998-2005.
16. Gaballa, A. and J.D. Helmann, *Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1998. **180**(22): p. 5815-21.
17. Garg, S., et al., *Redox biology of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: protein-protein interaction between GlgB and WhiB1 involves exchange of thiol-disulfide*. BMC Biochem, 2009. **10**: p. 1.
18. Glazer, A.N., *Phycocyanins*, in *Photchemical and Photobiological Reviews*, K.C. Smith, Editor. 1976, Plenum Press: New York. p. 71-115.

19. Gonzalez, A., et al., *Overexpression of FurA in Anabaena sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology*. Plant Cell Physiol. **51**(11): p. 1900-14.
20. Gonzalez, A., et al., *Unravelling the regulatory function of FurA in Anabaena sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis*. J Proteomics, 2011. **74**(5): p. 660-71.
21. Herdman, M., et al., *Genome size of cyanobacteria*. Journal of General Microbiology, 1978. **111**: p. 73-85.
22. Hernandez, J.A., et al., *Three fur homologues from Anabaena sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **236**(2): p. 275-82.
23. Hernandez, J.A., et al., *Interaction of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters*. Biometals, 2006. **19**(3): p. 259-68.
24. Hernandez, J.A., et al., *Identification of a furA cis antisense RNA in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. J Mol Biol, 2006. **355**(3): p. 325-34.
25. Hernandez, J.A., et al., *Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from Anabaena sp. PCC 7120*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 35-41.
26. Hernandez, J.A., et al., *FurA modulates gene expression of alr3808, a DpsA homologue in Nostoc (Anabaena) sp. PCC7120*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1351-6.
27. Herrera Cuadra, J.M., *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S*.
28. Kaneko, T., et al., *Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120*. DNA Res, 2001. **8**(5): p. 205-13; 227-53.
29. Kobayashi, T. and K. Ito, *Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the Escherichia coli disulfide bond formation pathway*. Embo J, 1999. **18**(5): p. 1192-8.
30. Lai, L.S., P.C. Chang, and C.T. Chang, *Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(17): p. 8121-9.
31. Latifi, A., et al., *Iron starvation leads to oxidative stress in Anabaena sp. strain PCC 7120*. J Bacteriol, 2005. **187**(18): p. 6596-8.
32. Latifi, A., M. Ruiz, and C.C. Zhang, *Oxidative stress in cyanobacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(2): p. 258-78.
33. Lee, J.W. and J.D. Helmann, *Functional specialization within the Fur family of metalloregulators*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 485-99.
34. Lopez-Gomollon, S., et al., *Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons*. J Mol Biol, 2007. **374**(1): p. 267-81.
35. Lopez-Gomollon, S., et al., *Expression of furA is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of Anabaena sp. PCC 7120*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 1): p. 42-50.
36. Lopez-Gomollon, S., et al., *New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from Anabaena protects DNA and increases cell survival under oxidative stress*. Biochem J, 2009. **418**(1): p. 201-7.

37. Ma, Z., S.E. Gabriel, and J.D. Helmann, *Sequential binding and sensing of Zn(II) by Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res.* **39**(21): p. 9130-8.
38. Ma, Z., F.E. Jacobsen, and D.P. Giedroc, *Metal transporters and metal sensors: how coordination chemistry controls bacterial metal homeostasis*. *Chemical reviews*, 2009. **109**(10): p. 4644-4681.
39. Marr, A.K., et al., *Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of Listeria monocytogenes in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(11): p. 3887-901.
40. Masse, E. and S. Gottesman, *A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4620-5.
41. Masuda, S., et al., *Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 7078-83.
42. Matzanke, B.F., et al., *FhuF, part of a siderophore-reductase system*. *Biochemistry*, 2004. **43**(5): p. 1386-92.
43. McHugh, J.P., et al., *Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29478-86.
44. Meeks, J.C., et al., *Cellular differentiation in the cyanobacterium Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol*, 2002. **178**(6): p. 395-403.
45. Molin, M., et al., *Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007. **43**: p. 136-144.
46. Napolitano, M., et al., *Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium Anabaena sp. Strain PCC 7120*. *J Bacteriol*. **194**(10): p. 2426-36.
47. Narayan, O.P., N. Kumari, and L.C. Rai, *Iron starvation-induced proteomic changes in Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120: exploring survival strategy*. *J Microbiol Biotechnol*. **21**(2): p. 136-46.
48. Nicolaisen, K., et al., *Alr0397 is an outer membrane transporter for the siderophore schizokinen in Anabaena sp. strain PCC 7120*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(22): p. 7500-7.
49. Rippka, R., et al., *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. *Journal of General Microbiology*, 1978. **111**: p. 1-61.
50. Thurman, R.G., H.G. Ley, and R. Scholz, *Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase*. *Eur J Biochem*, 1972. **25**(3): p. 420-30.
51. Tomitani, A., et al., *The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(14): p. 5442-7.
52. van de Meene, A.M., et al., *The three-dimensional structure of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. *Arch Microbiol*, 2006. **184**(5): p. 259-70.
53. Whitton, B.A. and M. Potts, *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. 2000: Kluwer Academic publishers.
54. Wiese, M., et al., *Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs*. *Mar Drugs*. **8**(7): p. 2185-211.
55. Wildman, R.B. and C.C. Bowen, *Phycobilisomes in blue-green algae*. *J Bacteriol*, 1974. **117**(2): p. 866-81.

56. Winterbourn, C.C., et al., *The estimation of red cell superoxide dismutase activity*. J Lab Clin Med, 1975. **85**(2): p. 337-41.
57. Xiong, J. and C.E. Bauer, *Complex evolution of photosynthesis*. Annual Review of Plant Biology, 2002. **53**: p. 503-521.
58. Zurawell, R.W., et al., *Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2005. **8**(1): p. 1-37.