

Andrés González Rodríguez

Nuevas funciones de las proteínas
Fur en cianobacterias:
Contribución a la definición del
regulón FurA en *Anabaena* sp.
PCC 7120

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Fillat Castejón, María Francisca

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

**NUEVAS FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS FUR
EN CIANOBACTERIAS: CONTRIBUCIÓN A LA
DEFINICIÓN DEL REGULÓN FURA EN ANABAENA
SP. PCC 7120**

Autor

Andrés González Rodríguez

Director/es

Fillat Castejón, María Francisca

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular



TESIS DOCTORAL

Nuevas funciones de las proteínas Fur en cianobacterias:
contribución a la definición del regulón FurA en
Anabaena sp. PCC 7120

Memoria presentada por:

Andrés González Rodríguez

Licenciado en Biología, para optar por el Grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad de Zaragoza

Diciembre, 2012

D^a. MARÍA FRANCISCA FILLAT CASTEJÓN, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral “**Nuevas funciones de las proteínas Fur en cianobacterias: contribución a la definición del regulón FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120**”, presentada por el Licenciado D. ANDRÉS GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, que la misma se corresponde con el proyecto de Tesis aprobado con el mismo nombre, y que reúne los requisitos para ser presentada por su autor para optar por el Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Para que así conste, se firma la presente en Zaragoza, 3 de diciembre de 2012.

Fdo.: María F. Fillat Castejón

A mis padres

ÍNDICE

Estructura de la Tesis	13
Abreviaturas	15
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	23
1 Las cianobacterias	23
1.1 Características generales.....	23
1.2 Clasificación.....	28
1.3 Origen, evolución e impacto ecológico.....	29
1.4 Diferenciación celular y metabolismo del nitrógeno.....	35
1.5 Paradoja del hierro: estrés férrico frente a estrés oxidativo.....	45
1.6 Manipulación genética, genómica y postgenómica.....	51
2 Regulación de la homeostasis del hierro en procariotas	57
2.1 Metabolismo del hierro.....	57
2.2 Reguladores transcripcionales de la homeostasis del hierro.....	59
2.3 La familia Fur.....	60
2.3.1 Especialización funcional.....	60
2.3.2 Unión al DNA y mecanismos de regulación.....	63
2.3.3 Estudios estructurales.....	69
2.3.4 Fur como regulador global de la transcripción.....	73
2.3.5 Regulación de Fur.....	75
3 Regulación mediada por Fur en cianobacterias	76
3.1 Proteínas Fur en cianobacterias.....	76
3.2 Antecedentes en la caracterización bioquímica y funcional de FurA de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	79
3.2.1 Propiedades físico-químicas.....	79
3.2.2 Reconocimiento y unión al DNA.....	80
3.2.3 Regulación de FurA.....	82
3.2.4 Estudios previos en la definición del regulón.....	82
OBJETIVOS	84

CAPÍTULO 1. Obtención y caracterización fenotípica de una estirpe de sobreexpresión de FurA en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	85
1.1 Abstract.....	86
1.2 Introduction.....	86
1.3 Materials and Methods.....	89
1.3.1 Strains and culture conditions.....	89
1.3.2 Nucleic acid manipulations.....	91
1.3.3 Construction of a <i>furA</i> -overexpressing strain.....	91
1.3.4 SDS-PAGE and Western blotting.....	92
1.3.5 Measurements of growth and pigments.....	92
1.3.6 Microscopy.....	93
1.3.7 Photosynthetic oxygen evolution.....	93
1.3.8 Antioxidant enzymes assays.....	94
1.3.9 Tolerance to oxidative stress induced by H ₂ O ₂	94
1.3.10 ROS determination.....	95
1.3.11 Semi-quantitative RT-PCR.....	96
1.3.12 EMSAs.....	96
1.4 Results.....	99
1.4.1 FurA overexpression from the copper-inducible <i>petE</i> promoter...	99
1.4.2 Overexpression of FurA alters cyanobacterial morphology.....	100
1.4.3 Overexpression of FurA decreases photosynthetic activity.....	103
1.4.4 Overexpression of FurA decreases catalase and superoxide dismutase activities.....	104
1.4.5 Overexpression of FurA induces changes in the transcriptional pattern of a variety of genes.....	107
1.4.6 Identification of novel FurA direct target genes.....	110
1.4.7 Metal co-repressor and reducing conditions are critical for the affinity of FurA for direct target genes.....	113
1.5 Discussion.....	114
 CAPÍTULO 2. Análisis proteómico comparativo de la estirpe de sobreexpresión <i>Anabaena</i> sp. AG2770FurA.....	 119

2.1 Abstract	120
2.2 Introduction	120
2.3 Materials and Methods	122
2.3.1 Bacterial strains and culture conditions.....	122
2.3.2 Protein extraction.....	123
2.3.3 2-D DIGE.....	123
2.3.4 Image acquisition and DIGE data analysis.....	124
2.3.5 MALDI-TOF MS analysis and protein identification.....	125
2.3.6 Reverse transcription (RT)-PCR.....	126
2.3.7 Electrophoretic mobility shift assays.....	127
2.4 Results	130
2.4.1 Proteomic profiles of <i>Anabaena</i> wild-type and <i>furA</i> -overexpressing strains.....	130
2.4.2 Transcriptional analysis of differentially expressed genes.....	136
2.4.3 Identification of FurA direct targets.....	136
2.4.4 Searching for a functional FurA box sequence.....	139
2.5 Discussion	141
 CAPÍTULO 3. FurA es el regulador máster de la homeostasis del hierro en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	149
3.1 Abstract	150
3.2 Introduction	150
3.3 Materials and Methods	154
3.3.1 Bacterial strains and culture conditions.....	154
3.3.2 Semi-quantitative reverse transcription (RT)-PCR.....	154
3.3.3 Electrophoretic mobility shift assays.....	155
3.3.4 DNase I footprinting analysis.....	159
3.3.5 <i>In silico</i> analyses.....	160
3.4 Results	160
3.4.1 FurA overexpression blocks the induction of iron metabolism genes under iron-restricted conditions.....	160
3.4.2 FurA is the master transcriptional regulator of iron metabolism in <i>Anabaena</i> sp.....	161

3.4.3	Iron deprivation transcriptionally induces enzymes involved in haem metabolism.....	166
3.4.4	FurA overexpression induces changes in the transcriptional pattern of haem metabolism enzymes.....	167
3.4.5	FurA regulates both synthesis and degradation of haem.....	169
3.4.6	Bioinformatic analysis of footprinted FurA binding sites reveals a putative regulatory consensus for iron-responsive genes.....	171
3.5	Discussion.....	174
CAPÍTULO 4.	FurA participa en la diferenciación a heterocistos.....	181
4.1	Abstract.....	182
4.2	Introduction.....	182
4.3	Materials and Methods.....	185
4.3.1	Strains and growth conditions.....	185
4.3.2	Heterocyst frequency, pattern spacing and microscopy.....	186
4.3.3	Acetylene reduction assay.....	186
4.3.4	Electrophoretic mobility shift assays.....	187
4.3.5	DNase I footprinting analysis.....	187
4.3.6	Real-time PCR.....	188
4.3.7	Bioinformatic tools.....	191
4.4	Results.....	191
4.4.1	Overexpression of <i>furA</i> partially inhibits heterocyst differentiation.....	191
4.4.2	FurA specifically binds <i>in vitro</i> to <i>ntcA</i> and <i>hetR</i> promoters.....	194
4.4.3	FurA influences heterocyst differentiation by controlling the expression of NtcA.....	196
4.5	Discussion.....	201
DISCUSIÓN GENERAL.....		207
	La sobreexpresión de FurA en <i>Anabaena</i> sp. como herramienta de estudio del regulón.....	209
	FurA como regulador global de la transcripción en cianobacterias.....	211
	FurA es el regulador máster de la homeostasis del hierro.....	218

FurA participa en la diferenciación a heterocistos.....	223
Unión de FurA al DNA.....	227
CONCLUSIONES	232
BIBLIOGRAFÍA	235
Agradecimientos	269

Estructura de la Tesis

La presente memoria de tesis consta de **Resumen**, **Introducción**, **Objetivos**, cuatro **Capítulos** que conforman el cuerpo principal de la tesis, un apartado de **Discusión General**, **Conclusiones** y **Referencias**.

El **Resumen** refleja de forma concisa los antecedentes y objetivos del trabajo, la metodología empleada, los resultados obtenidos y las conclusiones generales.

La **Introducción** describe a las cianobacterias como grupo microbiano objeto de estudio, abarcando aspectos generales como sus características morfológicas y fisiológicas, clasificación taxonómica, impacto ecológico y metodologías más empleadas para su manipulación genética. Además, se hace especial referencia a algunos aspectos de la fisiología de este grupo de microorganismos que resultarán de interés para la comprensión de los objetivos y resultados obtenidos en este trabajo, tales como la diferenciación celular a heterocistos o el esencial equilibrio entre la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo en cianobacterias. En la introducción se expone una amplia revisión sobre los mecanismos moleculares que regulan la homeostasis del hierro en procariotas, describiendo detalladamente el estado del arte en lo concerniente a la familia de reguladores transcripcionales Fur (*ferric uptake regulator*) y los estudios previos realizados con la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120. Tras la introducción se indican los **Objetivos** propuestos, teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos.

La metodología empleada para desarrollar los objetivos propuestos y los resultados obtenidos se encuentran reflejados en cuatro **Capítulos**, cada uno de los cuales presenta la estructura típica de un artículo científico. Los capítulos están redactados en inglés y reproducen el texto íntegro de artículos publicados, en prensa, o manuscritos en fase de revisión. En algunos casos se han introducido pequeñas modificaciones al formato original

del artículo o manuscrito, a fin de garantizar una homogeneidad de formato para todos los capítulos.

En cada uno de los capítulos se discuten los resultados obtenidos y sus implicaciones. En el apartado **Discusión General** se analizan los resultados íntegramente y se discuten aspectos de interés no tratados en detalle en las discusiones de los capítulos. Por último se indican las **Conclusiones** del trabajo de Tesis y se reflejan las **Referencias** bibliográficas utilizadas en toda la memoria en su conjunto. Para una mejor comprensión del trabajo, en los apartados Resumen y Discusión General, los resultados reflejados en el capítulo 4 son referenciados como (González *et al.*, In revision).

Abreviaturas

α-RNA	RNA antisentido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
Dps	<u>D</u> NA-binding protein in <u>s</u> tarved cells
DTT	Ditiotreitol
DtxR	<u>D</u> iphtheria <u>t</u> ox <u>i</u> n <u>r</u> epressor
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraácetico
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic <u>m</u> obility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay (Ensayo de retardo en gel)
Fur	<u>F</u> erric <u>u</u> ptake <u>r</u> egulator
FURTA	Fur titration assay
Fe-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de hierro
gfp	Proteína fluorescente verde
IMAC	<u>I</u> mmobilizad <u>m</u> etal ion <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography
Irr	<u>I</u> ron <u>r</u> esponse <u>r</u> egulator (Fur family)
kDa	Kilodaltons
Ma	Millones de años
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MS	Espectrometría de masas
Mur	<u>M</u> anganese <u>u</u> ptake <u>r</u> egulator (Fur family)
Nur	<u>N</u> ickel <u>u</u> ptake <u>r</u> egulator (Fur family)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
PerR	<u>P</u> eroxide-stress response <u>r</u> egulator (Fur family)

PS	Fotosistema
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RNase	Ribonucleasa
ROS	<u>R</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>t</u> ranscription-PCR
SELEX	<u>S</u> ystematic <u>e</u> volution of <u>l</u> igands by <u>e</u> xponential enrichment
SOD	Superóxido-dismutasa
sqRT-PCR	RT-PCR semicuantitativa
TBDT	Transportadores de membrana externa dependientes de TonB
TCA	Ácidos tricarboxílicos
tsp	<u>T</u> ranscriptional <u>s</u> tart <u>p</u> oint (Sitio de inicio de la transcripción)
Zur	<u>Z</u> inc <u>u</u> ptake <u>r</u> egulator (Fur family)
2-DE	Electroforesis bidimensional
2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial
2-OG	2-oxoglutarato

RESUMEN

Las proteínas Fur (*ferric uptake regulator*) actúan como reguladores globales de la transcripción en procariotas. Con un mecanismo clásico de represión transcripcional, estas proteínas regulan la expresión de los genes implicados en la incorporación y transporte de hierro en dependencia de la disponibilidad de este micronutriente. En situación de abundancia de Fe^{2+} intracelular, el ión metálico actúa como correpresor y se une al metalorregulador promoviendo en éste un cambio conformacional que incrementa su afinidad por secuencias específicas dentro de los promotores diana denominadas cajas Fur o “*iron boxes*”. La unión del complejo Fur- Fe^{2+} bloquea la unión de la RNA polimerasa inhibiendo la transcripción. De forma inversa, en situación de déficit de hierro el metal correpresor se libera del represor, la proteína Fur pierde afinidad por el DNA y se separa del promotor diana permitiendo la transcripción (Escolar *et al.*, 1999).

Numerosos estudios demuestran que las proteínas Fur modulan no sólo la expresión de los genes implicados en el metabolismo del hierro, sino además la de una gran variedad de genes y operones pertenecientes a procesos celulares tan diversos como la defensa frente al estrés oxidativo, la expresión de factores de virulencia, la motilidad y quimiotaxis, el metabolismo energético, el metabolismo intermediario o la defensa frente a estrés ácido, entre otras. Asimismo, en los últimos años han sido presentadas evidencias de regulación génica mediada por Fur que se alejan del mecanismo clásico de represión transcripcional, sugiriendo la activación directa o indirecta dependiente de hierro (Delany *et al.*, 2004; Masse & Gottesman, 2002; Mellin *et al.*, 2007) y en algunos casos la modulación transcripcional en ausencia del metal correpresor (Butcher *et al.*, 2012; Delany *et al.*, 2001). Esta variedad en los mecanismos de regulación, unida a la posible modulación de la expresión de otros reguladores transcripcionales (López-Gomollón *et al.*, 2007a; Teixido *et al.*, 2010), confiere a los regulones Fur una notable complejidad.

Los estudios funcionales de proteínas Fur en cianobacterias son escasos y limitados. Este grupo microbiano ampliamente distribuido en nuestro planeta ostenta características únicas entre los organismos procariotas, como la fotosíntesis oxigénica o la capacidad de diferenciación celular, la multicelularidad y la fijación diazotrófica del nitrógeno atmosférico (Flores & Herrero, 2008). Tanto la fotosíntesis oxigénica como la fijación del nitrógeno son procesos altamente sensibles a la disponibilidad de hierro, dados los altos requerimientos de este micronutriente como cofactor de proteínas transportadoras y enzimas esenciales. Por otro lado, las cianobacterias se encuentran más expuestas al daño celular por estrés oxidativo dada la inherente producción de especies reactivas del oxígeno durante la fotosíntesis oxigénica (Latifi *et al.*, 2009). En tal sentido, la regulación de la homeostasis del hierro resultará particularmente importante en este grupo microbiano a fin de asegurar un adecuado suministro de hierro para sus funciones vitales y minimizar al mismo tiempo la producción de radicales libres mediante las reacciones de Fenton. Dadas sus particularidades metabólicas, las proteínas Fur en cianobacterias pudieran estar implicadas en el control de funciones celulares no descritas con anterioridad en bacterias heterotróficas.

En el presente trabajo de tesis nos propusimos avanzar en el conocimiento de la funciones de las proteínas Fur en cianobacterias mediante el estudio del regulón FurA de la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120.

FurA parece constituir una proteína esencial bajo las condiciones estándar de cultivo *in vitro* (Hernández *et al.*, 2006b). Los intentos por obtener un mutante de delección del gen *furA* han conducido sólo a la segregación parcial de la mutación en el genoma poliploide, un fenómeno previamente observado con otros homólogos Fur de cianobacterias (Ghassemian & Straus, 1996). Como herramienta de trabajo para el estudio del regulón construimos una estirpe de sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120 (González

et al., 2010), empleando un vector lanzadera con orígenes de replicación en *E. coli* y *Anabaena sp.* que logró incrementar hasta ~32 veces el nivel de expresión del metalorregulador (González *et al.*, In press). Una vez obtenida la estirpe de sobreexpresión, denominada *Anabaena sp.* AG2770FurA, se procedió a realizar un análisis fenotípico de la nueva cepa con el objetivo de identificar los posibles cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares acontecidos en el microorganismo como consecuencia directa o indirecta de la sobreexpresión del regulador transcripcional. El análisis fenotípico incluyó la evaluación comparativa de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación en medio BG11, la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, carotenoides, ficobiliproteínas) y proteínas totales en diferentes fases del crecimiento, así como el estudio por microscopía óptica y electrónica de la morfología celular, la integridad de los filamentos, la autofluorescencia y la ultraestructura de las células. Se evaluó asimismo la actividad fotosintética según la evolución de oxígeno mediante electrodo de Clark y se compararon además actividades enzimáticas tales como catalasa y superóxido-dismutasa, la producción de especies reactivas del oxígeno y la tolerancia a estrés oxidativo tras la exposición a una fuente exógena de peróxido de hidrógeno (González *et al.*, 2010). Como parte del estudio fenotípico se realizó además un análisis proteómico comparativo entre la estirpe de sobreexpresión y la cepa isogénica parental crecidas bajo las mismas condiciones de cultivo (González *et al.*, 2011).

Sobre la base de los cambios fenotípicos observados se investigó el impacto de la sobreexpresión de FurA sobre la transcripción de una variedad de genes de interés mediante sqRT-PCR. Posteriormente, a fin de identificar los cambios en la expresión génica directamente mediados por FurA, se analizó mediante retardo en gel (EMSA) la afinidad *in vitro* de FurA recombinante a cada uno de los promotores de los genes evaluados previamente por sqRT-PCR.

La sobreexpresión del metalorregulador en *Anabaena* sp. indujo múltiples cambios fenotípicos en la cianobacteria como consecuencia de la variación en la expresión de una variedad de genes de categorías funcionales diversas, tanto dianas transcripcionales directas como otros genes. La combinación de estudios fenotípicos, análisis de la expresión génica/proteica y ensayos de afinidad *in vitro* del regulador condujeron a la identificación al menos 13 nuevas dianas transcripcionales directas, implicadas en procesos celulares tales como el metabolismo del hierro, las defensas frente el daño oxidativo, la fotosíntesis, la diferenciación a heterocistos, el metabolismo energético, la replicación del DNA, la morfología celular, entre otras (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011). Los resultados demostraban el papel de FurA como regulador global de la transcripción en cianobacterias, de forma similar a lo observado con proteínas Fur de bacterias heterotróficas.

Con el objetivo de profundizar en la función de FurA como regulador de la homeostasis del hierro, realizamos adicionalmente un estudio comparativo de la expresión génica de la estirpe de sobreexpresión en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, prestando especial interés en varios mediadores del metabolismo de este micronutriente esencial en *Anabaena* sp. PCC 7120 (González *et al.*, In press). Los resultados obtenidos demostraron el papel de FurA como regulador máster de la homeostasis del hierro en *Anabaena* sp., modulando la expresión de genes implicados en prácticamente cada etapa del metabolismo del hierro, incluyendo la adquisición, transporte, almacenamiento y consumo del hierro en la célula. Los resultados asociados a este experimento permitieron identificar por primera vez al regulador FurA como modulador transcripcional dual (represor y activador) de ruta de biosíntesis de tetrapirroles. La acción activadora de FurA sobre la transcripción los genes *hemK* (protoporfirinógeno-oxidasa) y *hemH* (ferroquelatasa) constituye el primer

ejemplo documentado de activación transcripcional directa de una proteína Fur en cianobacterias.

La participación de FurA como modulador transcripcional en procesos celulares típicos de cianobacterias como la fotosíntesis oxigénica o la diferenciación celular constituyó un objetivo de especial interés en nuestra investigación. La sobreexpresión del metalorregulador bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo condujo al bloqueo parcial del proceso de diferenciación a heterocistos en estadios tempranos del desarrollo (González *et al.*, In revision). Estudios de afinidad *in vitro* mediante EMSA y *footprinting* demostraron que FurA reconoce y se une específicamente al promotor de *ntcA*, lo cual determinaba que la sobreexpresión del metalorregulador afectara sensiblemente el incremento transitorio de NtcA que tiene lugar en las primeras horas del desarrollo y que resulta esencial para la ulterior expresión de una variedad de genes implicados en la cascada regulatoria que define al proceso de diferenciación. Los resultados de nuestras investigaciones y de trabajos previos de nuestro grupo sugieren que la expresión de FurA en el heterocisto está ligada al desarrollo del mismo, es regulada por NtcA y su abundancia en cada momento influye directamente en el normal proceso de diferenciación. FurA parece funcionar como un modulador de la expresión de *ntcA*, que regula adecuadamente los niveles de NtcA en las diferentes fases de desarrollo del heterocisto y constituye un punto clave de conexión entre la homeostasis del hierro y el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias.

Con la identificación de un gran número de nuevas dianas directas de FurA durante el transcurso de esta tesis fue posible además, mediante análisis *in silico* de varias secuencias protegidas por FurA en ensayos de *footprinting*, la definición de una posible secuencia reguladora consenso de 23 pb (TGATAAAAATTCTCAATAAATAA), que gobierna potencialmente la unión del metalorregulador a sus promotores diana (González *et al.*, In

press). En esta secuencia consenso fueron reconocidos al menos tres motivos de unión a proteínas Fur de 8 pb en disposición “*head-to-head-to-tail*”.

De modo general, los resultados del presente trabajo de tesis en su conjunto demuestran el papel de FurA como regulador global de la transcripción en cianobacterias, controlando mediante diferentes mecanismos de regulación no sólo la expresión de los genes implicados en el metabolismo del hierro, sino además la de una variedad de genes y operones implicados en múltiples funciones celulares, algunas de las cuales no descritas con anterioridad en bacterias heterotróficas. Los resultados obtenidos constituyen un importante aporte al conocimiento del papel de las proteínas Fur en la fisiología de las cianobacterias.

INTRODUCCIÓN

1 LAS CIANOBACTERIAS

1.1 Características generales

Las cianobacterias son bacterias Gram-negativas fotoautótrofas, constituyen el único grupo bacteriano capaz de realizar la fotosíntesis oxigénica y están presentes en casi todos los habitats de la Tierra (Madigan *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 2002; Whitton & Potts, 2000).

Morfológicamente las cianobacterias conforman un grupo microbiano muy diverso, su tamaño celular puede variar hasta 100 veces entre un género y otro, con formas unicelulares y multicelulares, filamentosas o coloniales (Fig. I.1). Los filamentos o tricomas constituyen filas de células individuales con sus respectivas membranas citoplasmáticas, que comparten una membrana externa común. Este tipo de organización multicelular permite un contacto más estrecho entre las células del filamento y determina la existencia de un periplasma continuo (Haselkorn, 2008; Mariscal *et al.*, 2007; Wilk *et al.*, 2011).

Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza poblando océanos y costas, suelos y aguas continentales, logrando subsistir e incluso proliferar con éxito en ambientes extremos como lagunas hipersalinas, fuentes geotermales o géiseres, desiertos y regiones polares (Jungblut *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 2007; Omoregie *et al.*, 2004; Pointing *et al.*, 2009; Taton *et al.*, 2006; Whitton & Potts, 2000). Algunas estirpes han establecido relaciones simbióticas con diversos organismos como hongos, plantas, protistas o esponjas (Adams & Duggan, 2008; Ahmadjian, 1993; Gehrig *et al.*, 1996; Whitton & Potts, 2000).

En determinadas condiciones nutricionales las cianobacterias que viven en ambientes acuáticos pueden crecer de forma masiva produciendo los denominados *blooms* o proliferaciones descontroladas, lo cual da lugar a problemas medioambientales (Whitton & Potts, 2000). Algunas estirpes de cianobacterias producen toxinas, genéricamente conocidas como cianotoxinas, las cuales pueden ser neurotóxicas, hepatotóxicas y dermatotóxicas. El contacto

o consumo de aguas o alimentos contaminados con estas estirpes tóxicas o sus toxinas tiene un gran impacto en la salud humana y animal (Carmichael, 1994; Carmichael *et al.*, 2001).

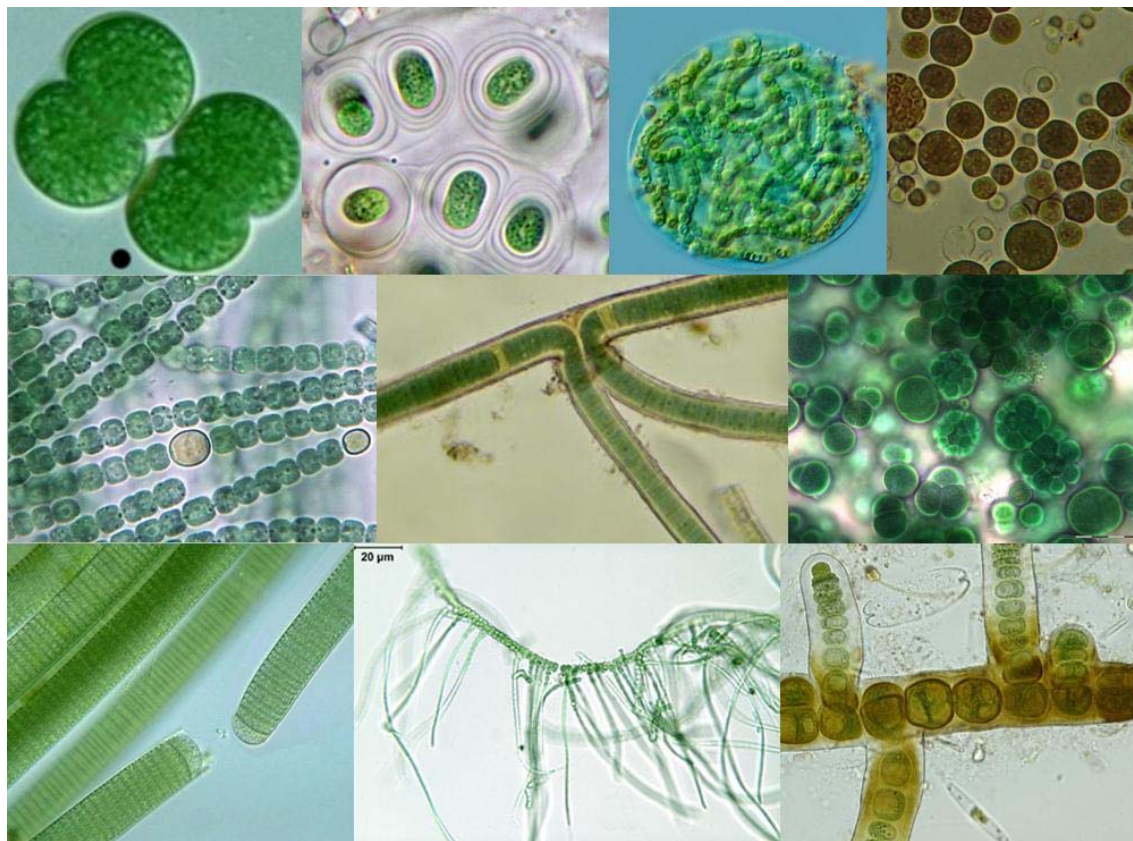


Figura I.1. Diversidad morfológica de las cianobacterias. En la imagen, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, estirpes pertenecientes a los géneros *Synechocystis*, *Gloeothecae*, *Nostoc*, *Dermocarpa*, *Anabaena*, *Scytonema*, *Pleurocapsa*, *Oscillatoria*, *Fischerella* y *Stigonema* (Imagen tomada del sitio web: <http://biosetal.blogspot.com.es>).

A pesar de su diversidad morfológica, las cianobacterias constituyen un grupo bastante homogéneo desde el punto de vista metabólico. Son organismos fotoautotrófos, aunque algunas especies pueden vivir en condiciones fotoheterotróficas o quimioheterotróficas, utilizando como fuente de carbono azúcares sencillos como glucosa, fructosa o sacarosa (Stal & Moezelaar, 1997). Poseen un metabolismo respiratorio, compartiendo algunos de los componentes de la cadena respiratoria con la cadena electrónica fotosintética (Schmetterer, 1994). La fijación de CO₂ atmosférico se realiza a través del ciclo de Calvin

y el glucógeno sintetizado es almacenado como material de reserva. Cuando estas reservas son necesarias se metabolizan mediante el ciclo de las pentosas fosfato, compartiendo ruta con azúcares exógenos ocasionales (Stanier & Cohen-Bazire, 1977).

Todas las cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, con un aparato fotosintético muy similar al de los cloroplastos de algas y plantas superiores, tanto en estructura como en funcionamiento. Sin embargo, los tilacoides bacterianos no están englobados por una membrana formando organelos como ocurre con los cloroplásticos, sino que se sitúan en la región periférica del citoplasma, paralelos a la membrana plasmática. Las membranas tilacoidales convergen en determinados puntos con la membrana plasmática, donde en algunos casos también está situado el centro tilacoidal, estructura cilíndrica asociada a la membrana tilacoidal (van de Meene *et al.*, 2006). La composición de pigmentos en las cianobacterias las distingue de otros organismos fotosintéticos, a diferencia de otras bacterias fotosintéticas (bacterias verdes y bacterias púrpuras) poseen clorofila *a*, y a diferencia de las plantas carecen de clorofila *b*. Algunas especies, como *Acaryochloris marina*, posee clorofila *d* como pigmento fotosintético mayoritario en vez de clorofila *a* (Ohashi *et al.*, 2008). El género *Prochlorococcus*, responsable del 30-80% de la fotosíntesis total en los océanos, no posee ficobilinas pero sí derivados divinilo de la clorofila *b* además de clorofila *a*, α -caroteno, zeaxantina y un pigmento relacionado con clorofila *c* (Partensky *et al.*, 1999). Las cianobacterias al igual que las algas rojas se distinguen por la presencia de estructuras supramoleculares localizadas en la membrana tilacoidal asociadas al fotosistema (PS) II denominadas ficobilisomas (Grossman *et al.*, 1993; van de Meene *et al.*, 2006). Los ficobilisomas están compuestos esencialmente por las ficobiliproteínas, proteínas hidrosolubles asociadas covalentemente a tetrapirroles lineales llamados ficobilinas que actúan como pigmentos fotosintéticos accesorios (Beale, 1994). Las ficobilinas absorben eficientemente la energía

luminosa a longitudes de onda donde la clorofila *a* lo hace de forma ineficiente, permitiendo a las cianobacterias habitar ecosistemas con diferentes intensidades luminosas, tanto aguas superficiales como profundas. La energía luminosa absorbida por las ficobilinas es luego transferida a la clorofila *a* para la fotosíntesis. Las ficobiliproteínas son especialmente abundantes en la célula, llegando a constituir más del 50% del contenido proteico total. Entre estas proteínas destacan la ficocianina, aloficocianina y en menor medida la ficoeritrina. En condiciones adversas, las ficobiliproteínas pueden servir como reservorio de carbono y nitrógeno (Grossman *et al.*, 1993).

Para su reproducción las cianobacterias emplean varios mecanismos: fisión binaria, gemación, fragmentación y fisión múltiple. En el último proceso una célula aumenta de tamaño y a continuación se divide varias veces para producir numerosas hijas de menor tamaño (beocitos), que se liberan al romperse la célula parental (Prescott *et al.*, 2002).

En el citoplasma de estos microorganismos podemos encontrar una variedad de inclusiones intracelulares, las cuales desempeñan un importante papel como reserva de nutrientes y cuya acumulación les permite sobrevivir ante condiciones adversas de deficiencia. Además del nucleóide, ribosomas y vesículas de gas, bajo el microscopio podemos observar carboxisomas, gránulos de glucógeno, gránulos de poliglucosa y poli- β -hidroxibutirato, gránulos de polifosfatos y cianoficina, gotas lipídicas, etc (Allen, 1984).

Las cianobacterias constituyen un raro ejemplo de diferenciación celular en procariotas, pudiendo distinguirse tres tipos de células especializadas que se desarrollan a partir del tipo celular básico o célula vegetativa, como son los hormogonios, los acinetos y los heterocistos. Los hormogonios son cadenas cortas de células distinguibles de las células vegetativas por su movilidad y por su diferente tamaño y estructura (Meeks *et al.*, 2002). Poseen reservas importantes de fósforo y nitrógeno, entre otros nutrientes, y son muy

importantes en procesos fisiológicos relacionados con la dispersión, reproducción y simbiosis.

Los acinetos son formas de resistencia que surgen cuando las condiciones son desfavorables para la supervivencia, como pueden ser exposición prolongada al frío, desecación o limitación de fosfatos (Meeks *et al.*, 2002). Se distinguen por el desarrollo de una gruesa envoltura celular y por la acumulación de sustancias de reserva, especialmente gránulos de glucógeno y cianoficina. En los acinetos desaparecen los gránulos de polifosfatos, cambia la composición de pigmentos, aumenta el contenido en RNA y se reducen paulatinamente la actividad fotosintética y biosintética, si bien la actividad respiratoria se mantiene relativamente alta. Una vez que las condiciones vuelvan a ser adecuadas para la célula, los acinetos poseen la capacidad de germinar y generar nuevas células vegetativas.

Los heterocistos son la forma de diferenciación celular mejor estudiada en cianobacterias (Wolk, 1996). Estas células diferenciadas están especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico y aparecen bajo condiciones de carencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo. Dada la alta sensibilidad del complejo enzimático de la nitrogenasa al oxígeno, en los heterocistos se establece un ambiente microaerofílico que garantiza la estabilidad de la enzima. Los profundos cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar durante el proceso de diferenciación a heterocisto serán tratados en detalle más adelante. Entre las células vegetativas y los heterocistos se establecerá una relación cooperativa, los primeros proveerán al resto del filamento de metabolitos ricos en nitrógeno mientras las células vegetativas suministran al heterocisto los esqueletos carbonados.

1.2 Clasificación

Las cianobacterias constituyen el grupo más amplio y diverso de bacterias fotosintéticas. Durante años se incluyeron erróneamente como un grupo dentro de las algas eucarióticas, siendo conocidas como algas verde-azules. Posteriormente, el empleo de la microscopía electrónica y de otras técnicas bioquímicas permitió clasificarlas como bacterias Gram-negativas. La clasificación de las cianobacterias ha tenido diferentes esquemas taxonómicos (Boone *et al.*, 2001; Cavalier-Smith, 2002; Rippka *et al.*, 1979). Según la segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Boone *et al.*, 2001) el phylum *Cyanobacteria* describe 56 géneros agrupados en 5 subsecciones u órdenes (Tabla I.1)

Tabla I.1. Clasificación de las cianobacterias según la segunda edición del Manual de Bergey

Subsección	Forma general	Reproducción y crecimiento	Heterocistos	% GC	Géneros representativos
I	Bacilos o cocos unicelulares, agregados no filamentosos	Fisión binaria, gemación	-	31-71	<i>Microcystis</i> <i>Synechococcus</i> <i>Synechocystis</i> <i>Prochlorococcus</i>
II	Bacilos o cocos unicelulares, pueden mantenerse unidos por una pared externa	Fisión múltiple para formar beocitos	-	40-46	<i>Pleurocapsa</i> <i>Dermocarpa</i> <i>Chroococcidiosis</i> <i>Xenococcus</i>
III	Tricoma filamentosos no ramificados con sólo células vegetativas	Fisión binaria en un único plano, fragmentación	-	34-67	<i>Oscillatoria</i> <i>Spirulina</i> <i>PseudAnabaena</i> <i>Lyngbya</i>
IV	Tricoma filamentosos no ramificados que pueden contener células especializadas	Fisión binaria en un único plano, fragmentación y formación de hormogonios	+	38-47	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Nodularia</i> <i>Cylindrospermum</i>
V	Tricoma filamentosos ramificados o compuestos por más de una fila de células	Fisión binaria en más de un plano, formación de hormogonios	+	42-46	<i>Fischerella</i> <i>Stigonema</i> <i>Geitleria</i> <i>Stigonema</i>

1.3 Origen, evolución e impacto ecológico

La vida en nuestro planeta se originó hace al menos 3500 millones de años (Ma) o incluso antes, durante el Eón Arcaico. Sin embargo, la capacidad bioquímica de utilizar el agua como fuente de electrones en la fotosíntesis evolucionó en un ancestro común de las cianobacterias actuales hacia finales del Arcaico, entre 3000 y 2700 Ma. Las primeras cianobacterias eran unicelulares, no fijaban nitrógeno y habitaban ambientes terrestres o de agua dulce; más tarde colonizaron océanos, aparecieron formas filamentosas y algunas estirpes evolucionaron hacia la fijación diazotrófica del nitrógeno atmosférico (Flores & Herrero, 2008).

Tras la aparición de las primeras cianobacterias y su paulatina diversificación y proliferación a finales del Arcaico y principios del Proterozoico, el oxígeno producido por la fotosíntesis oxigénica comenzó a exceder los niveles de consumo de este gas que ocurría como consecuencia de procesos físicos, tales como la oxidación de especies químicas reducidas, predominantemente Fe^{2+} y gases volcánicos. La acumulación de oxígeno durante varios cientos de millones de años en la atmósfera y los océanos conllevó a una oxigenación permanente de la biosfera hacia el Proterozoico temprano (2450-2320 Ma). Sin embargo, los niveles de oxígeno de esta atmósfera primitiva permanecieron relativamente bajos (quizás el 10% de los niveles actuales) hasta finales del Proterozoico, cuando emergió otro grupo de organismos con fotosíntesis oxigénica, los eucariotas fotosintéticos, en cuyo origen las cianobacterias jugaron también un papel trascendental (Flores & Herrero, 2008).

El origen de los eucariotas fotosintéticos se explica en la actualidad a través de la teoría endosimbiótica o endosimbiosis seriada, propuesta por Lynn Margulis en 1967, que describe tres procesos endosimbióticos sucesivos. En un primer proceso, una arqueobacteria se estableció como endosimbionte dentro de una bacteria anaerobia dando

lugar a un organismo unicelular con núcleo definido. En un proceso endosimbiótico posterior, una bacteria aerobia se establecería como endosimbionte dentro del nuevo organismo eucariótico aún anaerobio en lo que sería el origen de las actuales mitocondrias, dando lugar a una nueva célula eucariota más compleja, con la capacidad de metabolizar el oxígeno. Un tercer proceso endosimbiótico daría lugar al ancestro común de todos los eucariotas fotosintéticos actuales, cuando un eucarionte aerobio estableció simbiosis con una cianobacteria dando origen a los cloroplastos actuales (Keeling, 2010). Los primeros organismos eucarióticos fotosintéticos fueron las algas verdes, que proliferaron a finales del Proterozoico en todos los ambientes acuáticos, tanto en formas unicelulares como pluricelulares, dando lugar más tarde a un nuevo grupo de organismos fotosintéticos multicelulares, las plantas terrestres.

El paso de una atmósfera anoxigénica reductora a una oxigénica, iniciado por las cianobacterias y posteriormente favorecido por los eucariotas fotosintéticos, supuso un profundo cambio medioambiental que condujo a la eventual extinción o reducción significativa de las poblaciones microbianas anaerobias estrictas que hasta el momento dominaban los ecosistemas terrestres, repercutiendo considerablemente en el incremento de la diversidad biológica y el surgimiento de organismos eucarióticos más complejos (Flores & Herrero, 2008; Holland, 2006).

En la actualidad las cianobacterias constituyen una parte taxonómicamente diversa, productiva y biogeoquímicamente importante del fitoplancton de océanos, costas y estuarios, jugando un papel esencial en los ciclos del carbono y nitrógeno (Whitton & Potts, 2000). Las cianobacterias contribuyen a la producción primaria y el ciclo de los nutrientes mediante dos formas principales. En primer lugar, son importantes y muchas veces dominantes fijadores fotoautotróficos del CO₂, contribuyendo significativamente a la producción primaria y ciclo del carbono. Aproximadamente la mitad del total de la

producción primaria en la Tierra ocurre en los océanos. Algunos géneros de cianobacterias unicelulares como *Synechococcus*, *Prochlorococcus* y *Synechocystis* son comunes y frecuentemente dominantes dentro de las comunidades de fitoplancton en aguas subsuperficiales, donde pueden representar hasta el 80% de la biomasa presente (Partensky *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 2002; Whitton & Potts, 2000). La importancia de estas especies bacterianas como productores primarios en la cadena trófica se incrementa sustancialmente si tenemos en cuenta que habitan fundamentalmente en las grandes zonas oligotróficas de los océanos, caracterizadas por la carencia de nutrientes, aspecto limitante para el crecimiento de otros organismos.

En segundo lugar, algunos géneros cianobacterianos pueden fijar el nitrógeno atmosférico y convertir el dinitrógeno molecular en amonio. De forma similar, este proceso es de particular relevancia en vastas regiones oceánicas caracterizadas por deficiencias de nitrógeno, donde el amonio producido por la fijación del nitrógeno atmosférico representa una fuente de nitrógeno que soporta al resto de la cadena trófica. La capacidad de fijación de nitrógeno permite a ciertas cianobacterias marinas integrantes del fitoplancton proliferar como densos *blooms* superficiales en aguas deficientes de nitrógeno en océanos, costas y estuarios (Whitton & Potts, 2000). Varios géneros diazotróficos de cianobacterias marinas aparecen usualmente formando asociaciones mutualistas o simbióticas con microalgas, macroalgas, protistas, plantas y animales. Estas relaciones mutuamente ventajosas para ambas especies son especialmente importantes en ambientes deficientes de nitrógeno.

La distribución de las diferentes poblaciones de cianobacterias en los océanos es influenciada por una variedad de factores biológicos y ambientales, tales como la temperatura, la concentración de nutrientes e iones metálicos esenciales, la intensidad y calidad de la luz, la proporción superficie/volumen de la masa de agua, la mortalidad por cianofagos y predadores, entre otras (Behrenfeld & Kolber, 1999; Mann, 2003; Ting *et al.*,

2002; Whitton & Potts, 2000). En especial, la limitación del crecimiento de las cianobacterias en océanos y otros ambientes acuáticos debido a la baja biodisponibilidad del hierro constituye un aspecto particularmente relevante que abordaremos con mayor profundidad más adelante en este trabajo.

El impacto ecológico de las cianobacterias en la naturaleza también se ve reflejado en las denominadas proliferaciones o *blooms*. El término “*bloom*” generalmente define un incremento muy significativo de la biomasa de una población microbiana en relación al promedio habitual de esta población en un ecosistema dado. De esta forma se describen en la literatura *blooms* de cianobacterias, de diatomeas, de dinoflagelados, etc (Qin *et al.*, 2010; Vargas-Montero & Freer, 2004; Watkins *et al.*, 2008). Cuando las condiciones ambientales son apropiadas, las cianobacterias pueden llegar a dominar la microbiota de ríos, lagos y reservorios de agua dulce. Sin embargo, el concepto de *bloom* de cianobacterias también es relativo; los límites legales de concentración celular que definen las proliferaciones de cianobacterias en aguas de consumo o recreacionales, >20000 células/ml (W.H.O., 2003), son bajos en comparación con los impresionantes *blooms* que bajo determinadas condiciones ambientales logran formarse en lagos y lagunas (Fig. I.2).

La creciente eutrofización de ríos y lagos, debido principalmente al vertido de aguas residuales, detergentes, fertilizantes, entre otras sustancias; unido a condiciones ambientales favorables tales como temperaturas cálidas o templadas, alta intensidad de luz, pH neutro o básico y ausencia de vientos, son algunos de los factores asociados a las proliferaciones incontroladas de cianobacterias (Paerl, 2008; Paul, 2008). Varios estudios coinciden en destacar la relevancia de la eutrofización y la relación fósforo/nitrógeno en el desencadenamiento de proliferaciones de cianobacterias. El incremento de la relación P/N como resultado de la eutrofización a menudo conduce a un aumento significativo de las especies formadoras de *blooms* dentro del ecosistema (Havens *et al.*, 2003; Paerl, 2008).

Las proliferaciones de mayor impacto ecológico son frecuentemente visibles a simple vista debido a la acumulación superficial de una gran concentración de biomasa procedente de cianobacterias flotantes o móviles. Las cianobacterias formadoras de estos *blooms* incluyen tanto especies unicelulares como filamentosas, de tamaños diversos, fijadoras y no fijadoras de nitrógeno, que en muchos casos destacan por la presencia de vacuolas de gas que permiten su proliferación en la superficie. Dentro de las cianobacterias formadoras de *blooms* podemos encontrar géneros unicelulares como *Microcystis* y *Gomphosphaeria*, filamentosos no formadores de heterocistos como *Lyngbya* y *Oscillatoria* y filamentosos formadores de heterocistos como *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis* y *Aphanizomenon* (Havens, 2008; Whitton & Potts, 2000).



Figura I.2. Proliferación o *bloom* de cianobacterias en la laguna “Estanca de Alcañiz”, provincia de Teruel (foto tomada en octubre de 2002 por miembros de nuestro laboratorio).

Las proliferaciones de cianobacterias tienen impactos visibles sobre el ecosistema como la disminución de la calidad del agua (sabor, olor, apariencia), la reducción de las plantas sumergidas debido a la disminución de la radiación solar que penetra en la columna líquida o el cambio de la comunidad de peces y otros miembros de la fauna acuática a causa de anoxia hipolimnética (Havens, 2008). Sin embargo, la capacidad de algunas especies formadoras de *blooms* de producir metabolitos secundarios altamente tóxicos para la vida silvestre, animales domésticos y el hombre, genéricamente conocidos como cianotoxinas, constituye en la actualidad uno de los aspectos más importantes desde el punto de vista económico y ecológico relacionado con este grupo microbiano.

Las cianotoxinas pueden ocasionar la muerte de peces por daños en las branquias, tracto digestivo, hígado y otros órganos (Malbrouck & Kestemont, 2006; Marie *et al.*, 2012). La ingestión directa de cianobacterias en la toma de agua o el consumo de animales acuáticos ocasiona efectos tóxicos y muerte en insectos, moluscos, crustáceos, aves y mamíferos, incluyendo el hombre (Funari & Testai, 2008; Giannuzzi *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2008). Los efectos en animales superiores pueden incluir reacciones alérgicas, gastroenteritis, daños hepáticos, daños neurológicos, ataxia, fallo respiratorio y muerte.

Existe una variedad de especies productoras y tipos de cianotoxinas. Las cianotoxinas pueden ser clasificadas en función de su estructura química como péptidos cíclicos (microcistina y nodularina), alcaloides [anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, cilindrospermopsina, aplisiatoxina, lingbiatoxina-a] y lipopolisacáridos, o ser clasificadas en función de su toxicidad (dermatotoxinas, hepatotoxinas y neurotoxinas) (Carmichael, 1994; van Apeldoorn *et al.*, 2007).

1.4 Diferenciación celular y metabolismo del nitrógeno

Varias estirpes de cianobacterias, tanto unicelulares como filamentosas, son capaces de crecer diazotróficamente fijando el nitrógeno atmosférico en ausencia de fuentes de nitrógeno combinado como amonio, nitratos, nitritos o urea (Herrero *et al.*, 2001). Dado que el complejo enzimático responsable de la reducción del dinitrógeno molecular hasta amonio, la nitrogenasa, es extremadamente sensible al oxígeno, las cianobacterias han desarrollado diferentes estrategias de protección de la nitrogenasa tanto del oxígeno atmosférico como de aquel producido intracelularmente resultado de la fotosíntesis oxigénica. Estas estrategias están basadas en dos principios fundamentales: la separación temporal de la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno en una misma célula según el reloj biológico circadiano, o la separación espacial de los dos procesos incompatibles mediante la multicelularidad y la diferenciación celular. (Berman-Frank *et al.*, 2003). De esta forma, algunas cianobacterias diazotróficas como la unicelular *Cyanothece* sp. realizan la fotosíntesis y almacenan glucógeno durante las horas de luz, para luego fijar nitrógeno durante la noche (Toepel *et al.*, 2008). Por su parte la cianobacteria filamentosas no formadora de heterocistos *Trichodesmium* sp. disminuye la actividad fotosintética en ciertas células especializadas denominadas diazocitos; la fijación de nitrógeno en estas células es máxima incluso durante el día (Sandh *et al.*, 2012). No obstante, una gran variedad de estirpes filamentosas desarrollan células diferenciadas denominadas heterocistos, las cuales han perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis y están completamente especializadas en la fijación de nitrógeno (Kumar *et al.*, 2010).

Los heterocistos aseguran un ambiente prácticamente anóxico en su interior debido al engrosamiento de la pared celular por la incorporación de dos capas adicionales, una de polisacáridos y otra de glicolípidos. La capa de glicolípidos reduce la permeabilidad al oxígeno, mientras la capa de polisacáridos, más externa, engrosa y aumenta la rigidez de la

envoltura celular protegiéndola de daños físicos (Nicolaisen *et al.*, 2009). Los heterocistos asimismo incrementan su tasa de respiración aerobia para consumir las pocas moléculas de oxígeno que logran atravesar la pared celular, a la vez que degradan las ficobiliproteínas y desmantelan el PSII a fin de eliminar completamente la producción de oxígeno como consecuencia de la fotosíntesis (Kumar *et al.*, 2010). De esta forma, tras la diferenciación a heterocistos la cianobacteria multicelular dispone de dos tipos celulares mutuamente interdependientes: las células vegetativas, que proveen al heterocisto de compuestos carbonados y poder reductor, y los heterocistos, que exportan compuestos nitrogenados en forma de aminoácidos hacia las células vegetativas (Flores & Herrero, 2010).

Los heterocistos se diferencian siguiendo un típico patrón de espaciamiento a lo largo del filamento. En el caso de la cianobacteria filamentosa diazotrófica *Anabaena* sp. PCC 7120, tras la ausencia de nitrógeno combinado se formará un heterocisto por cada 10-12 células vegetativas como promedio. Tanto el proceso de diferenciación en si mismo, como el patrón de formación de los heterocistos a lo largo del filamento estarán determinados por la acción coordinada de una variedad de señales internas y externas ligadas al desarrollo del heterocisto, incluyendo la acción de múltiples factores transcripcionales, enzimas, metabolitos, proteínas de membrana, así como varios reguladores positivos y negativos cuyo mecanismo de acción en muchos casos aún se desconoce (Flores & Herrero, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006).

En *Anabaena* sp. PCC 7120, los heterocistos completamente diferenciados se logran apreciar usualmente tras 24 horas de la eliminación de la fuente de nitrógeno combinado, aunque este tiempo puede variar con las condiciones de cultivo empleadas en cada laboratorio. Los heterocistos son usualmente distinguibles de las células vegetativas por su tamaño ligeramente mayor, forma algo más redondeada, pared celular engrosada por la deposición de polisacáridos y glicolípidos, disminución de la pigmentación y pérdida de

autofluorescencia por la degradación de los ficobilisomas, así como la presencia de gránulos de cianoficina en los polos adyacentes a las células vegetativas (Fig. I.3).

Los profundos cambios morfológicos y fisiológicos que sufre una célula vegetativa durante la diferenciación a heterocisto son el resultado de una gran variación en la expresión génica, que implica la inducción de unos genes, el silenciamiento de otros, e incluso la escisión y reordenamiento de algunas secuencias génicas en los cromosomas del futuro heterocisto (Ehira & Ohmori, 2006b; Flaherty *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2010; Mitschke *et al.*, 2011). Estudios de microarrays evaluando las diferencias en los patrones transcripcionales tras 3, 8 y 24 horas de la eliminación del nitrógeno combinado indican que al menos 495 genes aumentan significativamente su expresión y 196 genes disminuyen su expresión en *Anabaena* durante el proceso de diferenciación a heterocistos (Ehira & Ohmori, 2006b). Sin embargo, la inducción o represión de la mayoría estos genes no ocurre al unísono, los cambios transcripcionales van ligados al desarrollo del heterocisto, lo cual determina que la síntesis y acción de determinado regulador o producto génico ocurra en determinado momento del desarrollo, y muchas veces su efecto es sólo transitorio, llegando a ser inaparente o nulo en otro estadio de la diferenciación (Kumar *et al.*, 2010).

La presencia de una fuente de nitrógeno combinado inhibe la diferenciación a heterocistos; de hecho, el proceso de diferenciación una vez iniciado es reversible si se adiciona una fuente de nitrógeno combinado al medio de cultivo dentro de las 9-12 horas después de inducida la deficiencia de nitrógeno, pasado este tiempo las células invariablemente culminarán la diferenciación (Kumar *et al.*, 2010).

El proceso de diferenciación a heterocistos se inicia con una señal metabólica de deficiencia de nitrógeno combinado en el medio, la acumulación de un intermediario del ciclo de Krebs: 2-oxoglutarato (2-OG) (Muro-Pastor *et al.*, 2001).

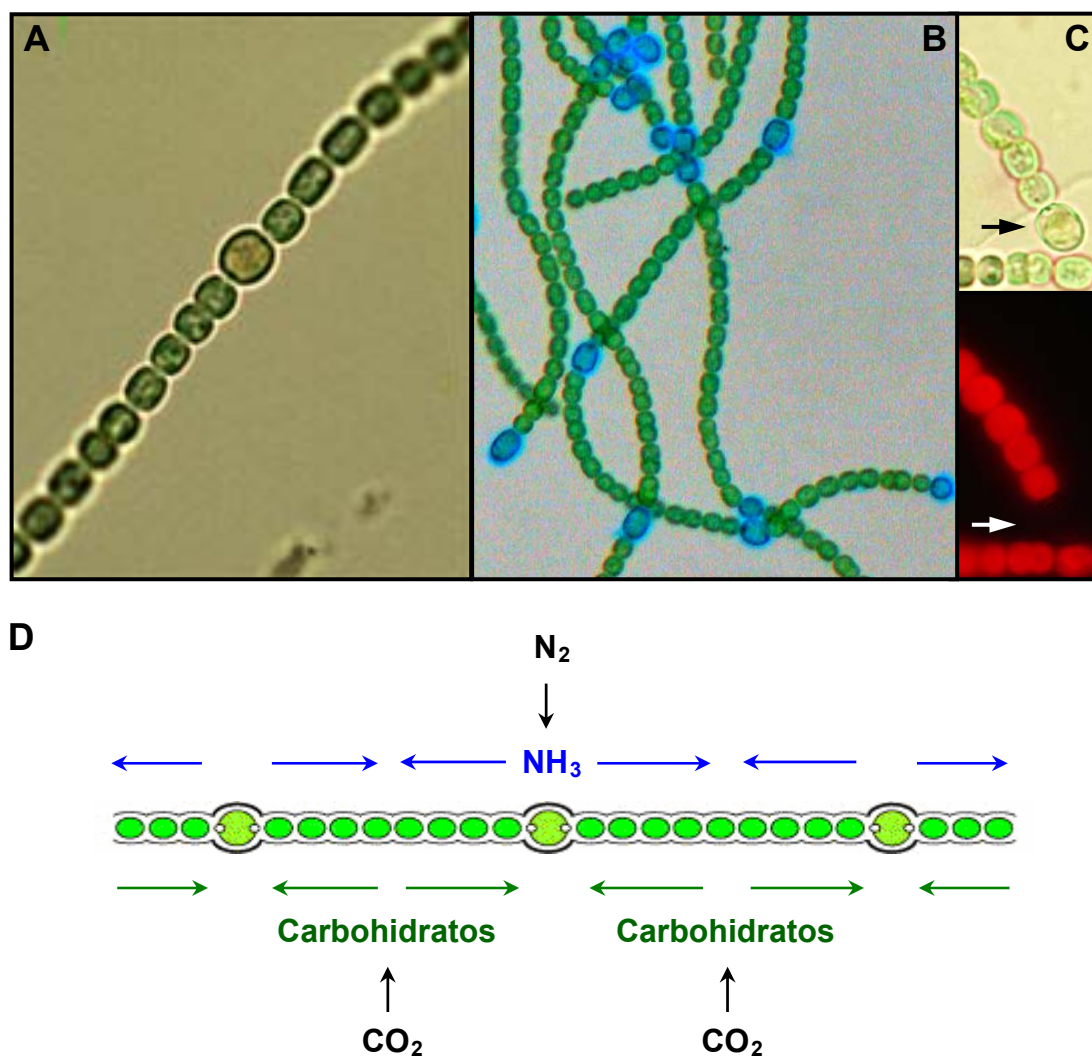


Figura I.3. La diferenciación a heterocistos en estirpes de cianobacterias filamentosas define dos tipos celulares mutuamente interdependientes. (A) Los heterocistos maduros son usualmente distinguibles de las células vegetativas por su mayor tamaño, pared celular engrosada, pérdida de la pigmentación y presencia de típicos gránulos de cianoficina en los polos adyacentes a las células vegetativas. (B) Los heterocistos se diferencian siguiendo un típico patrón de espaciamiento. En la imagen, heterocistos de *Anabaena* sp. PCC 7120 teñidos con azul de Alcian. (C) Tras la degradación de los ficobilisomas, los heterocistos pierden la capacidad de autofluorescencia que caracteriza a las células vegetativas debido a los pigmentos fotosintéticos. (D) Las células vegetativas proveen al heterocisto de compuestos carbonados y potencial reductor, mientras los heterocistos proveen al resto del filamento de compuestos nitrogenados (Golden & Yoon, 2003).

En cianobacterias el ciclo de Krebs es incompleto debido a la ausencia de la enzima 2-OG deshidrogenasa, debido a lo cual el 2-OG tiene como principal función la de servir como precursor para la síntesis de una variedad de metabolitos. En estos organismos, la asimilación del amonio ocurre mediante la acción coordinada de dos enzimas, la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, que emplean el 2-OG como esqueleto carbonado para la síntesis de glutamato (Muro-Pastor *et al.*, 2005). Bajo condiciones de limitación de nitrógeno combinado se incrementan los niveles de 2-OG en el interior de la célula, lo que determina un aumento en la actividad de unión al DNA del regulador global del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias, NtcA (Herrero *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2004), iniciándose así una cascada regulatoria que culmina con la diferenciación de células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (Fig. I.4).

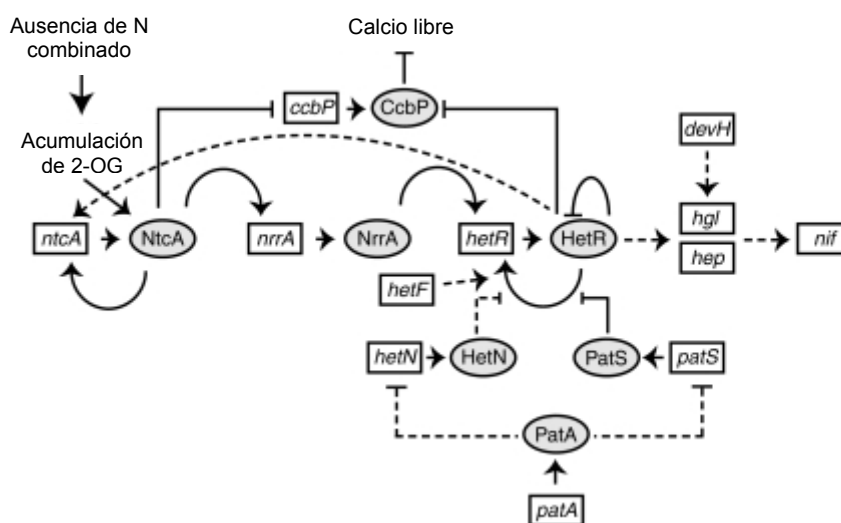


Figura I.4. Cascada regulatoria que tiene lugar durante el proceso de diferenciación a heterocisto donde se muestran sólo algunos de los genes implicados (Kumar *et al.*, 2010). Los genes y sus productos génicos se han separado por flechas pequeñas. Las interacciones con efecto positivo o negativo se han representado por líneas terminadas en cabezas de flecha o barras, respectivamente. Las líneas discontinuas representan interacciones indirectas o de naturaleza desconocida.

NtcA es un regulador transcripcional perteneciente a la familia CAP o CRP (proteína receptora de AMP cíclico), está conservado en todas las cianobacterias, se autorregula y regula positivamente la expresión de los genes implicados en la asimilación de amonio y nitrato (Herrero *et al.*, 2001). Tras una deficiencia de nitrógeno combinado y la ulterior acumulación de 2-OG, los niveles de NtcA preexistentes en presencia de 2-OG activan la expresión del regulador máster de la diferenciación a heterocistos, HetR (Buikema & Haselkorn, 2001) por mediación de NrrA (Ehira & Ohmori, 2006a). HetR es una serín-proteasa con actividad autocatalítica que muestra además actividad de unión al DNA. *hetR* es uno de los primeros genes inducidos durante la diferenciación a heterocistos, su transcripción se incrementa después de tan sólo 30 minutos de inducida la deficiencia de nitrógeno en todas las células del filamento, sin embargo, tras 3,5 horas su expresión resulta sólo confinada a las células que se diferenciarán a heterocistos, cumpliendo el típico patrón de espaciamiento (Black *et al.*, 1993).

Este confinamiento de la inducción de la expresión de HetR sólo en las células que se diferencian definirá el patrón de espaciamiento de los heterocistos dentro del filamento. En estadios iniciales de la diferenciación, las células con una incipiente diferenciación activan por mediación de HetR la expresión de PatS, un péptido que difunde hacia las células vecinas e inhibe la diferenciación en estas últimas por bloqueo de la actividad de unión al DNA de HetR (Huang *et al.*, 2004b). De esta forma, PatS define el típico patrón de espaciamiento de una célula diferenciada por cada 10-12 células vegetativas en los estadios iniciales de la diferenciación a heterocistos en *Anabaena* sp (Wu *et al.*, 2004). Este patrón será mantenido una vez culminada la diferenciación gracias a la acción inhibitoria de HetN sobre la expresión de HetR en las células no diferenciadas (Callahan & Buikema, 2001; Li *et al.*, 2002a).

La inducción de HetR promueve recíprocamente un incremento transitorio en la expresión de NtcA alrededor de las 5 horas de inducida la deficiencia de nitrógeno, hasta alcanzar un máximo entre las 8-9 horas, para luego disminuir nuevamente (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Esta mutua dependencia en la expresión de NtcA y HetR en los estadios iniciales de la diferenciación del heterocisto resultará crucial como señal positiva para la continuidad del proceso de diferenciación y de ella dependerá la expresión ulterior de varios genes esenciales en el desarrollo del heterocisto (Kumar *et al.*, 2010). Tanto NtcA como HetR resultan esenciales en el proceso de diferenciación a heterocistos: los mutantes de *ntcA* no inducen la expresión de *hetR* y son incapaces de crecer auxotróficamente (Frias *et al.*, 1994); los mutantes de delección de *hetR* no producen heterocistos (Buikema & Haselkorn, 1991).

Uno de los cambios fisiológicos más significativos que tiene lugar durante los estadios iniciales de la diferenciación a heterocistos lo constituye la variación en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Kumar *et al.*, 2010). Tras 4 horas de inducida la deficiencia de nitrógeno, las células en diferenciación presentan unos niveles de calcio libre intracelular 10 veces superiores a aquellos presentes en las células vegetativas (Zhao *et al.*, 2005). Este incremento de la concentración de Ca^{2+} ocurre a una disminución de la expresión de la proteína secuestradora de calcio CcbP por la acción conjunta de NtcA y HetR (Shi *et al.*, 2006). La unión de NtcA dependiente de 2-OG al promotor de *ccbP* regula negativamente su transcripción llegando a anular completamente su expresión en los heterocistos maduros, mientras la proteína CcbP es degradada por HetR, cuya actividad serín-proteasa es dependiente de Ca^{2+} . Aunque hasta la fecha no se conoce con exactitud el papel esencial del Ca^{2+} libre intracelular en el desarrollo del heterocisto, se piensa que el incremento de los niveles de Ca^{2+} es importante para la actividad proteolítica de muchas proteasas

dependientes de calcio esenciales en el proceso de diferenciación, como HetR (Kumar *et al.*, 2010).

Otros productos génicos que actúan en los estadios iniciales del proceso de diferenciación son HetC, HetF, PatA, HetL y Asr1734 (Flores & Herrero, 2010; Kumar *et al.*, 2010). HetC es una proteína con gran similitud de secuencia a un transportador de tipo ABC de membrana plasmática y juega un papel esencial en la regulación de los estadios iniciales de la diferenciación (Khudyakov & Wolk, 1997). La expresión de *hetC* está regulada por NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 1999) y se incrementa en proheterocistos alrededor de las 4 horas de inducida la deficiencia de nitrógeno (Khudyakov & Wolk, 1997). Esta temprana inducción de *hetC* parece modular negativamente la expresión de *ftsZ* (Wang & Xu, 2005), un componente crítico en la maquinaria de división celular. Los mutantes de delección de *hetC* muestran un patrón de células semirregularmente espaciadas que inician la diferenciación pero no la culminan, estas células asimismo no pierden la capacidad de división celular como ocurre con los heterocistos y la diferenciación queda interrumpida en sus estadios iniciales (Xu & Wolk, 2001). La expresión de varios genes implicados en la morfogénesis del heterocisto como *hepA* (formación de la capa de polisacáridos) o *hglD* y *hglE* (formación de la capa de glicolípidos) parece depender de HetC. De igual forma, *pata* (formación del patrón de espaciamiento) y *patB*, *xisA*, *nifB* (diferenciación citoplasmática en estadios tardíos del desarrollo del heterocisto) dependen de HetC para su expresión (Wang & Xu, 2005).

Tanto HetF como PatA influyen en el proceso de diferenciación a heterocistos mediante un efecto positivo sobre la expresión de HetR (Risser & Callahan, 2008); sin embargo, sus mecanismos de acción son diferentes. HetF parece ser una cisteín-proteasa (Risser & Callahan, 2008), es esencial para el desarrollo del heterocisto (Wong & Meeks, 2001) y necesario para la activación de varios promotores dependientes de HetR (Risser &

Callahan, 2008). PatA por su parte parece ser una proteína reguladora que se activa por fosforilación (Liang *et al.*, 1992), su efecto está relacionado con la formación y mantenimiento del patrón de espaciamiento entre heterocistos y al parecer actúa atenuando el efecto negativo de PatS y HetN sobre la expresión de HetR (Orozco *et al.*, 2006).

HetL y Asr1734 actúan regulando el desarrollo del heterocisto, pero su mecanismo de acción y función exacta permanecen sin descifrar. La sobreexpresión de HetL estimula la diferenciación; sin embargo, los mutantes de delección de este gen muestran un desarrollo de heterocistos y un crecimiento diazotrófico similar a la estirpe silvestre, lo cual sugiere una función regulatoria no esencial (Liu & Golden, 2002). Asr1734 regula negativamente el proceso de diferenciación; la sobreexpresión de *asr1734* inhibe la diferenciación a heterocistos, mientras los mutantes de delección de este gen muestran un ligero fenotipo Mch (multiple contiguous heterocysts) (Wu *et al.*, 2007).

Pasadas 8 o 9 horas de la eliminación de la fuente combinada de nitrógeno y tras haberse iniciado la cascada regulatoria que desencadena la diferenciación, en la que son protagonistas mayormente los productos génicos descritos con anterioridad, se inician una serie de cambios estructurales y fisiológicos en lo que se conocen como proheterocistos tempranos (Kumar *et al.*, 2010; Nicolaisen *et al.*, 2009). Estos cambios comienzan con la morfogénesis de la envoltura celular de los heterocistos, mediante la deposición de una capa externa de polisacáridos y una bicapa adicional más interna de glicolípidos, ambas ubicadas exteriormente a la membrana externa bacteriana (Nicolaisen *et al.*, 2009).

La deposición de la capa externa de polisacáridos es uno de los primeros cambios morfológicos que acontecen durante la diferenciación, está mediado por un sistema regulador de dos componentes formado por HepK y DevR (Zhou & Wolk, 2003) y en el intervienen una variedad de genes como *hepA*, *hepB* y *hepC*, entre otros (Huang *et al.*, 2005; López-Igual *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2007). La capa de glicolípidos comienza a ser

ensamblada en los proheterocistos algo más tarde que la capa de polisacáridos (Nicolaisen *et al.*, 2009) y en la síntesis de estos glicolípidos intervienen igualmente un variado número de genes incluyendo *hglB*, *hglC*, *hglD*, *hglE*, *hglK* y *hglT*, entre otros (Fan *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2010). DevH a su vez es una proteína reguladora requerida para la síntesis de la capa de glicolípidos, aunque su mecanismo exacto de acción no se conoce con exactitud (Ramirez *et al.*, 2005). En la exportación de los glicolípidos desde el citoplasma participa un transportador de membrana plasmática de tipo ABC, codificado por el operón *devBCA* (Fiedler *et al.*, 1998) y un transportador de membrana externa de tipo TolC, codificado por el gen *hgdD* (Moslavac *et al.*, 2007a). El operón *devBCA* es expresado sólo en heterocistos, mientras *hgdD* resulta inducido durante la diferenciación. Ambos transportadores resultan esenciales para la formación de la capa de glicolípidos y la protección de la nitrogenasa del oxígeno externo. Los mutantes de delección de cualquiera de los dos transportadores muestran un bloqueo de la morfogénesis en etapas muy tempranas de la diferenciación, carecen de la capa de glicolípidos y son incapaces de fijar nitrógeno en condiciones aerobias (Fiedler *et al.*, 1998; Moslavac *et al.*, 2007a). La expresión de *devBCA* es regulada positivamente por NtcA (Fiedler *et al.*, 2001).

La diferenciación del protoplasma y maduración de los heterocistos también dependerá de la ocurrencia de otros eventos trascendentales que ocurrirán en estadios más avanzados del desarrollo del heterocisto, teniendo especial relevancia los reordenamientos programados de regiones cromosómicas. En *Anabaena* sp. PCC 7120, los genes para la fijación del nitrógeno (genes *nif*) se expresan específicamente en el heterocisto, entre las 18 y 24 horas de iniciada la diferenciación (Elhai & Wolk, 1990). Los genes que codifican para el complejo enzimático de la nitrogenasa se encuentran organizados en el operón *nifHDK* (Golden *et al.*, 1991), ubicado muy próximo a otro operón de genes *nif*, el *nifB-fdxN-nifS-nifU* (Mulligan & Haselkorn, 1989). En *Anabaena* tienen lugar al menos tres

reordenamientos génicos ligados al desarrollo del heterocisto, que ocurren en los estadios finales de la diferenciación e involucran los dos operones *nif* antes mencionados y un tercer operón, el *hupSL*, que codifica para una hidrogenasa específica de heterocistos que recupera poder reductor desde el H₂ producido por la nitrogenasa (Carrasco *et al.*, 1995; Carrasco & Golden, 1995). Estos reordenamientos se producen como resultado de recombinaciones sitio-específicas entre secuencias repetitivas que flanquean los elementos que serán eliminados.

Un primer reordenamiento escinde un fragmento de 11 kilobases (kb) del gen *nifD*, mediado por la recombinasa XisA, cuyo gen se encuentra localizado dentro del fragmento escindido (Henson *et al.*, 2008). Un segundo reordenamiento escinde un fragmento de 55 kb del gen *fdxN*, mediado por la recombinasa XisF y los productos génicos de *xisH* y *xisI* (Carrasco *et al.*, 1994; Ramaswamy *et al.*, 1997). El tercer y último reordenamiento programado ocurre en el gen *hupL*, escinde un fragmento de 10,5 kb y es mediado por la recombinasa XisC (Carrasco *et al.*, 1995; Carrasco *et al.*, 2005). Los tres reordenamientos ocurren en estadios finales de la diferenciación del heterocisto y son esenciales para la expresión de los genes donde se encuentran: *nifD*, *fdxN* y *hupL* (Kumar *et al.*, 2010).

1.5 Paradoja del hierro: estrés férrico frente a estrés oxidativo

El paso de una atmósfera reductora a una atmósfera oxidante hace ~2300 Ma, debido a la proliferación de las cianobacterias y la ulterior evolución de los eucariotas fotosintéticos, tuvo un enorme impacto ecológico cuyas consecuencias continúan moldeando la biodiversidad de cada uno de los ecosistemas que existen actualmente en nuestro planeta. La acumulación de oxígeno en la atmósfera como resultado de la fotosíntesis permitió la evolución de los organismos aerobios y el uso metabólico de este elemento como aceptor de electrones; sin embargo, las especies reactivas del oxígeno (ROS) que invariablemente

se generaban como resultado de la reducción del oxígeno molecular durante la respiración aerobia o por su energización durante la fotosíntesis tenían efectos nocivos sobre biomoléculas y redes metabólicas originalmente evolucionadas bajo el ambiente anóxico de la Tierra primitiva (Imlay, 2003). Por otro lado, el oxígeno atmosférico producía la oxidación y precipitación de iones metálicos como el hierro, dando lugar a una muy baja biodisponibilidad de este micronutriente esencial aún cuando su concentración en la corteza terrestre era elevada. La forma ferrosa Fe^{2+} , inicialmente predominante bajo una atmósfera anoxigénica y con una relativamente alta solubilidad (0,1 M a pH 7), pasó mayormente al estado férrico extremadamente insoluble (10^{-18} M a pH 7) (Andrews *et al.*, 2003). De esta forma, la atmósfera oxigénica impuso dos presiones evolutivas a los organismos vivos cuyos resultados son hoy evidentes en la mayoría de los grupos microbianos: (1) el desarrollo de estrategias de autodefensa frente al daño potencial de las ROS generadas por su propio metabolismo y (2) la generación de mecanismos que contribuyeran a mejorar la biodisponibilidad del hierro.

El hierro es un elemento de transición que puede adoptar dos estados redox estables fácilmente intercambiables, la forma ferrosa Fe^{2+} y la forma férrica Fe^{3+} . A su vez, cada uno de estos estados redox puede adoptar diferentes estados de espín, dependiendo del entorno de su ligando. Esta alta flexibilidad físico-química unida a su gran abundancia como componente de la corteza terrestre hicieron del hierro la elección evolutiva ideal para su incorporación como grupo prostético extremadamente versátil en las proteínas, ya sea como transportador de electrones y mediador redox o como centro catalítico (Andrews *et al.*, 2003). Hoy en día el hierro constituye un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de prácticamente la totalidad de los organismos vivos, actuando como cofactor en una variedad de procesos celulares incluyendo la fotosíntesis, respiración, fijación del

nitrógeno, síntesis de ácidos nucleicos, ciclo TCA, defensa frente estrés oxidativo, entre otros.

En organismos fotosintéticos como las cianobacterias, el hierro resulta particularmente necesario como componente esencial de cada complejo proteico de membrana y de algunas proteínas solubles que conforma la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis (Ferreira & Strauss, 1994). Sólo para una unidad funcional del aparato fotosintético en cianobacterias se requieren entre 22 y 23 átomos de hierro como mínimo: 3 átomos de hierro en el PSII, 5 átomos de hierro en el complejo citocromo *b₆/f*, 12 átomos de hierro en el PSI y 2 átomos en el centro Fe-S de la ferredoxina, mientras 1 átomo adicional será requerido si se emplea el citocromo *c-553* en lugar de plastocianina (Zhang *et al.*, 1992). El alto contenido en hierro del aparato fotosintético determina que los requerimientos de este micronutriente en cianobacterias excedan con creces aquellos de bacterias heterotróficas; en *Synechocystis* sp. PCC 6803, el contenido de hierro celular (10^6 átomos/célula) excede en 1 orden de magnitud al de una bacteria no fotosintética de tamaño similar como *Escherichia coli* (Keren *et al.*, 2004).

La baja biodisponibilidad del hierro en presencia de oxígeno y a pH neutro determina que muchos de los nichos ecológicos ocupados en la actualidad por microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias presenten concentraciones tan bajas de este micronutriente esencial, que limitan el crecimiento de los productores primarios (Geider & La Roche, 1994; Morel & Price, 2003). En vastas regiones oceánicas la concentración de hierro se encuentra por debajo de 1 nM, limitando la producción primaria, la acumulación de biomasa y la estructura del ecosistema en regiones de mar abierto del Pacífico ecuatorial, el Pacífico subártico y el océano Glacial Antártico, e incluso en algunas zonas costeras (Street & Paytan, 2005).

La baja disponibilidad de hierro en los océanos limita igualmente la fijación de nitrógeno por cianobacterias diazotróficas (Kupper *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007). La diazotrofia impone una demanda adicional de hierro, más allá de la necesaria para la fotosíntesis y la respiración, dado que el complejo enzimático de la nitrogenasa contiene hasta 36 átomos de hierro por enzima. De esta forma, los patrones de distribución de la fijación de nitrógeno oceánica se ven usualmente influenciados por la disponibilidad de hierro, muchas veces de forma intermitente debido al enriquecimiento casual por las deposiciones de polvo provenientes, por ejemplo, del desierto del Sahara (Mills *et al.*, 2004; Sohm *et al.*, 2011).

La deficiencia de hierro ocasiona una variedad de cambios morfológicos y fisiológicos en las cianobacterias, siendo quizás la pérdida de la pigmentación celular (clorosis) producto de la degradación de los ficobilisomas, la reducción del número de tilacoides y la disminución del contenido de ficocianinas y clorofila el cambio más evidente (Guikema & Sherman, 1983; Sherman & Sherman, 1983). Ante un estrés férrico, las cianobacterias reemplazan las proteínas que contienen hierro como cofactor por otras que desempeñen igual función y no requieren hierro, como la ferredoxina por flavodoxina (IsiB) (Razquin *et al.*, 1994), cambian los patrones de absorción y fluorescencia (Ferreira & Strauss, 1994; Guikema & Sherman, 1983), el crecimiento se ralentiza y las células aparecen algo más pequeñas (Narayan *et al.*, 2011; Sherman & Sherman, 1983; Wilhelm, 1995) y se produce estrés oxidativo (Latifi *et al.*, 2005). Como señal inequívoca de deficiencia de hierro se induce la expresión de IsiA (conocida también como CP43'), una proteína análoga a la proteína de unión a clorofila CP43 del PSII, la cual se asocia al PSI formando un supercomplejo de tres PSsI rodeados por un anillo de 18 moléculas de CP43' capaces de unir hasta 180 moléculas de clorofila (Boekema *et al.*, 2001). La formación de estos supercomplejos incrementa la capacidad de captación de la luz del PSI y parece constituir

una estrategia de compensación ante la pérdida de los ficobilisomas con la deficiencia de hierro (Bibby *et al.*, 2001). El anillo de CP43' parece actuar además como disipador no radiactivo de energía, protegiendo al PSII de una excitación excesiva bajo condiciones de deficiencia de hierro, evitando la fotoinhibición (Park *et al.*, 1999; Sandstrom *et al.*, 2001). La limitación de hierro induce además la expresión de otros mecanismos adaptativos en cianobacterias como las proteínas IdiA, IdiB e IdiC descritas en *Synechococcus* (Michel *et al.*, 1996; Nodop *et al.*, 2008; Pietsch *et al.*, 2007) o el operón *sufBCDS* (Wang *et al.*, 2004); no obstante, los cambios transcripcionales en respuesta a un déficit de hierro en el ambiente llegan a abarcar hasta 781 genes en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Singh *et al.*, 2003).

Paradójicamente, el hierro es esencial para el crecimiento pero resulta altamente tóxico si no se controlan los niveles de hierro intracelular, dada su tendencia a catalizar la formación de ROS mediante la reacción de Fenton y generar estrés oxidativo (Imlay, 2003; Repine *et al.*, 1981). La presencia de 1 mM de FeSO₄ en el medio de cultivo es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Anabaena* sp. (Lammers & Sanders-Loehr, 1982). De esta forma, aunque resulte importante para la bacteria desarrollar mecanismos que aseguren el suministro de hierro para sus funciones vitales, resultará igualmente importante asegurar que el contenido de hierro intracelular sea mantenido por debajo de niveles tóxicos, por lo que toda la maquinaria de incorporación, transporte y almacenamiento de hierro se encuentra estrictamente regulada en función de la disponibilidad de hierro y su empleo por la célula. La regulación de la homeostasis del hierro en bacterias ocurre típicamente a nivel transcripcional, mediado por proteínas reguladoras que modulan la expresión de los genes del metabolismo del hierro en dependencia de la disponibilidad de este micronutriente (Andrews *et al.*, 2003). La descripción y los mecanismos de acción de estos reguladores

transcripcionales en bacterias y en especial en cianobacterias serán abordados en detalle más adelante.

Al ser organismos fotoautotróficos, las cianobacterias se encuentran más expuestas al daño oxidativo que las bacterias heterotróficas, debido a la inherente producción de ROS que ocurre durante la fotosíntesis (Imlay, 2003; Latifi *et al.*, 2009). Las ROS, que incluyen al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), constituyen poderosos agentes oxidantes que reaccionan con gran número de biomoléculas como proteínas, lípidos, pigmentos y ácidos nucleicos, afectando estructuras celulares, inactivando funciones enzimáticas e inhibiendo procesos metabólicos vitales. Como en el resto de los organismos aerobios, las cianobacterias generan O_2^- y H_2O_2 durante la respiración aerobia debido principalmente a la autooxidación de flavoenzimas que participan en la cadena transportadora de electrones (Imlay, 2003). Adicionalmente, durante la fotosíntesis la clorofila en estado excitado puede transferir energía al oxígeno originando $^1\text{O}_2$, una reacción que ocurre espontáneamente ante la abundancia de clorofila excitada y será proporcional a la intensidad de luz, llegando a inactivar el PSII en un fenómeno conocido como fotoinhibición (Aro *et al.*, 1993; Ohnishi *et al.*, 2005). Por otro lado, si la intensidad de luz sobrepasa las capacidades normales de flujo electrónico durante la fotosíntesis, se producirá un fenómeno conocido como reacción de Mehler, en la cual el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones en lugar de la ferredoxina, generando O_2^- como producto primario (Latifi *et al.*, 2009).

Las cianobacterias han desarrollado diferentes estrategias de defensa frente al estrés oxidativo, encaminadas a prevenir la producción de ROS o a neutralizar estas especies una vez producidas. La producción de compuestos antioxidantes no enzimáticos como carotenoides y α -tocoferol (Latifi *et al.*, 2009), la síntesis de enzimas detoxificantes como catalasas (Banerjee *et al.*, 2012a; Bernroitner *et al.*, 2009), peroxidasas (Banerjee *et al.*,

2012b; Cha *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008; Latifi *et al.*, 2007; Ogola *et al.*, 2009) y superóxido-dismutasas (Eitinger, 2004; Li *et al.*, 2002b), la síntesis de proteínas de unión al DNA (proteínas Dps) con actividad ferroxidasa dependiente de H₂O₂ (Franceschini *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007; Peña & Bullerjahn, 1995), así como diferentes mecanismos de disipación de energía y protección del aparato fotosintético frente a altas intensidades de luz (Havaux *et al.*, 2005; He *et al.*, 2001; Kirilovsky, 2007; Latifi *et al.*, 2009) son algunas de las estrategias que conforman el arsenal de defensas de las cianobacterias frente al daño oxidativo.

1.6 Manipulación genética, genómica y postgenómica

Desde la segunda mitad del siglo pasado, las cianobacterias han sido utilizadas como modelos para el estudio de numerosos procesos fisiológicos, tales como la fotosíntesis y su control genético, la fotorregulación de la expresión génica, la diferenciación celular y la fijación de nitrógeno, el metabolismo del nitrógeno, del carbono y del hidrógeno, la resistencia a estreses ambientales diversos y la evolución molecular, entre otros (Koksharova & Wolk, 2002a). Asimismo, las cianobacterias han sido empleadas con éxito para fines biotecnológicos incluyendo la producción de productos específicos como pigmentos, la biodegradación de contaminantes orgánicos de aguas superficiales y el control de plagas de insectos, entre otros propósitos (Abed *et al.*, 2009). En los últimos años, las potencialidades de estos microorganismos han aumentado considerablemente con la disponibilidad de sus secuencias genómicas y el desarrollo de herramientas para su manipulación genética.

Uno de los puntos críticos en la manipulación genética de las cianobacterias ha sido la transferencia génica (Koksharova & Wolk, 2002a). La transferencia de genes en bacterias puede realizarse por transformación, transducción y conjugación. La electroporación ha

sido utilizada en diversas cianobacterias, tanto unicelulares como filamentosas, pero su eficiencia de transformación puede ser baja y poco reproducible (Moser *et al.*, 1993; Muhlenhoff & Chauvat, 1996; Thiel & Poo, 1989). A pesar de intensos estudios con varios cianofagos, incluyendo cepas lisogénicas, la transducción no ha sido posible en cianobacterias debido a la no existencia hasta la fecha de vectores virales capaces de transducir a estos microorganismos (Koksharova & Wolk, 2002a).

La conjugación ha sido y continúa siendo el método más utilizado para la transferencia génica en cianobacterias (Koksharova & Wolk, 2002a; Vioque, 2007). Las cianobacterias presentan una estructura y composición de pared típica de Gram-negativos, siendo posible la transferencia de DNA plasmídico por conjugación desde otras bacterias como *Escherichia coli*. La familia de plásmidos RP4, perteneciente al grupo de incompatibilidad P (Thomas & Smith, 1987), agrupa plásmidos conjugativos que pueden mediar la transferencia de otros vectores plasmídicos corresidentes entre un amplio rango de bacterias Gram-negativas, incluyendo las cianobacterias (Wolk *et al.*, 1984). Un vector plasmídico podrá ser movilizable por estos plásmidos conjugativos si contiene (o se le incluye) una región conocida como “origen de transferencia” (*oriT*) o “base de movilización” (*bom*), así como el gen *mob*, cuyo producto génico reconoce específicamente la región *oriT* (Willetts & Wilkins, 1984). Una variedad de vectores plasmídicos ampliamente utilizados en ingeniería genética como el pBR322 conservan la región *oriT* o sitio *bom* de su plásmido parental, pero sin embargo han perdido el gen *mob*; estos vectores podrán ser transferidos sólo si el producto de este gen es proporcionado en *trans* por otro vector, conocido como plásmido ayudante. De esta forma en la conjugación participarán tres vectores plasmídicos: el plásmido conjugativo (usualmente derivados de RP4), el plásmido de carga (contiene el sitio *oriT* y el DNA de interés a ser transferido) y el plásmido ayudante (contiene el gen *mob* y otros genes de interés, Ej: DNA metilasas).

En el proceso participarán tres cepas bacterianas: una cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido conjugativo, una segunda cepa de *E. coli* conteniendo los plásmidos de carga y ayudante, y la cepa de cianobacteria que recibirá el DNA, por tal motivo la conjugación en cianobacterias también se conoce como apareamiento triparental (Elhai & Wolk, 1988).

La construcción de plásmidos de carga con orígenes de replicación tanto para *E. coli* como para cianobacterias (Ej: origen del plásmido pDU1 de *Nostoc* 7524) ha permitido la obtención de vectores replicativos o *shuttle vectors*, capaces de transferirse por conjugación y autorreplicarse en cianobacterias (Wolk *et al.*, 1984). De no contar con esta capacidad de autorreplicación, el vector transferido podrá integrarse al cromosoma bacteriano por recombinación homóloga, si se hubieran incorporado suficientes regiones de homología.

El uso de vectores replicativos o de vectores integrativos estará en dependencia de los fines experimentales de la transformación. Los vectores integrativos carecen de origen de replicación en el hospedador, pero cuentan con amplias zonas de homología (cientos de pares de bases) que permiten eventos de recombinación homóloga entre el vector y el cromosoma bacteriano. La recombinación tendrá como consecuencia la integración total de vector en el cromosoma o la sustitución de la región homóloga en el cromosoma por la que contiene el vector, lo cual estará en dependencia de la ocurrencia de simples o dobles entrecruzamientos o *crossing-overs*; este último evento resultará de especial interés durante la generación de mutantes de delección o *knock out* (Hernández *et al.*, 2006b). Sin embargo, dependiendo de la cepa de cianobacteria, la doble recombinación puede resultar un fenómeno poco frecuente, para lo cual la incorporación del gen *sacB* en el vector a transferir, cuya expresión resulta letal en presencia de altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo, pudiera resultar de gran utilidad en la selección de dobles recombinantes (Cai & Wolk, 1990). Eventos de recombinación simple también pueden

conllevar a la inactivación de un gen, si el vector integrado interrumpe la región codificadora (Pernil *et al.*, 2008).

Los vectores replicativos por su parte, son de gran utilidad para la expresión de copias extracromosómicas de un gen nativo (Brusca *et al.*, 1990; Buikema & Haselkorn, 2001; Liu & Golden, 2002; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007) o para la expresión de genes heterólogos (Li *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007; Xiaoqiang *et al.*, 1997; Zahalak *et al.*, 1995). Para estos fines ha resultado también de especial interés el uso de promotores fuertes y regulables tanto nativos (Buikema & Haselkorn, 2001; Wu *et al.*, 2007; Xiaoqiang *et al.*, 1997) como heterólogos (Brusca *et al.*, 1990; Elhai, 1993; Xiaoqiang *et al.*, 1997). El empleo de promotores regulables ha sido igualmente una herramienta fundamental en la generación de fenotipos condicionalmente letales, de gran utilidad para la identificación de genes esenciales (Callahan & Buikema, 2001).

Para muchas cianobacterias, la presencia de endonucleasas de restricción nativas, que degradan el DNA exógeno transferido, constituye un elemento que limita sustancialmente la eficiencia de transformación. Tal es el caso de los isosquisómeros de las enzimas *AvaI*, *AvaII* y *AvaIII* presentes en *Anabaena sp.* PCC7120. La eliminación de estas secuencias de restricción en el DNA a transferir, o la metilación del DNA *in vivo* antes de ser transferido gracias a la inclusión de los genes para DNA metilasas específicas en los vectores “ayudantes”, han permitido incrementar considerablemente la eficiencia de transformación por conjugación en cianobacterias (Elhai *et al.*, 1997).

Como marcadores de la transformación en cianobacterias se utilizan usualmente genes de resistencia a antibióticos como neomicina, estreptomycin/espectinomycin y en menor medida bleomicina y cloranfenicol (Koksharova & Wolk, 2002a). La incorporación de genes reporteros como el gen de la luciferasa (*luxAB*) o de la proteína fluorescente verde (*gfp*) permite, mediante luminiscencia o fluorescencia, no sólo demostrar la transferencia

génica, sino además constituye un método sensible para medir el nivel de transcripción, pudiendo comparar incluso la transcripción del mismo gen en tipos celulares diferentes de un mismo filamento (Koksharova & Wolk, 2002a). El gen *lacZ* de la β -galactosidasa, el gen *cat* de la cloranfenicol-acetiltransferasa o el gen *uidA* de la β -glucuronidasa también han sido utilizados como reporteros en cianobacterias (Koksharova & Wolk, 2002a).

El impresionante avance en las técnicas de biología molecular y secuenciación de DNA ha permitido, tal y como ha ocurrido con otros organismos, la secuenciación de un gran número de genomas de cianobacterias. En la actualidad se dispone de la información génica de más de 30 genomas cianobacterianos, todos disponibles *online* en la base de datos conocida como “Cyanobase” del Kazusa DNA Research Institute de Japón (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). Esta información ha brindado una inestimable herramienta de trabajo para los estudios de estructura, organización y función génica, caracterización molecular y funcional de proteínas y constituye la base de los actuales avances en el campo de la transcriptómica y la proteómica.

Los estudios genómicos han permitido conocer la diversidad genética existente en cianobacterias, reflejada en el número, tamaño y contenido en G+C de los genomas cianobacterianos. La mayoría de las cianobacterias son poliploides, es decir, poseen copias múltiples de su genoma, incluso los representantes morfológicamente más simples, como *Synechococcus* o *Synechocystis*, contienen más de 3 cromosomas idénticos por célula (Griese *et al.*, 2011). Se estima que *Anabaena* sp. PCC 7120 contiene entre ocho y diez copias del cromosoma por célula (Hu *et al.*, 2007). El tamaño de los genomas está entre 2 y 13 Mb, pudiendo exceder al de cualquier otro grupo bacteriano. El contenido en G+C cubre prácticamente el rango completo de valores encontrado entre procariotas, pudiéndose encontrar contenidos desde el 37% en *Synechocystis* sp. PCC 6308 hasta un 71% en *Synechococcus* sp. PCC 6307.

El genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 fue completamente secuenciado y publicado en el año 2001 (Kaneko *et al.*, 2001). Está conformado por un cromosoma de 6,4 Mb y 5 plásmidos identificados por las letras griegas α , β , γ , δ , ϵ y ζ , con tamaños que oscilan entre 5 y 400 Kb. El cromosoma bacteriano presenta un contenido G+C de un 41% y contiene las secuencias codificadoras para 5368 potenciales proteínas. Los plásmidos presentan un contenido G+C muy similar al cromosómico, en un rango del 40 al 44%, y en ellos se ubican genes implicados en la replicación y recombinación del DNA, la síntesis de cofactores y grupos prostéticos, el metabolismo energético, entre otras funciones.

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de muchas cianobacterias ha permitido realizar numerosos estudios de expresión global de genes mediante *microarrays*, así como la identificación y comparación de fenotipos diversos mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MS).

El desarrollo de los *microarrays* ha permitido el estudio de los cambios transcripcionales que tienen lugar en *Anabaena* sp. PCC 7120 como respuesta a la deshidratación y rehidratación de la célula (Higo *et al.*, 2007), a un incremento en la concentración de sales en el medio de cultivo (Imashimizu *et al.*, 2005) y a los cambios bruscos en la temperatura de crecimiento (Ehira *et al.*, 2005), entre otras situaciones de estrés ambiental (Sato *et al.*, 2004).

Análisis de proteómica en *Anabaena* sp. PCC 7120 han permitido caracterizar, cuantificar y comparar la expresión proteica global de la célula en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno (Stensjo *et al.*, 2007), comparar el proteoma de células vegetativas y heterocistos bajo condiciones de fijación de nitrógeno (Ow *et al.*, 2008), analizar la expresión proteica en la membrana externa (Moslavac *et al.*, 2005) o en la pared celular de los heterocistos (Moslavac *et al.*, 2007b).

Estudios de transcriptómica y proteómica también han sido empleados en otras cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Huang *et al.*, 2004a; Pisareva *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Nodop *et al.*, 2008), *Anabaena variabilis* (Barrios-Llerena *et al.*, 2007), *Prochlorococcus marinus* MED4 (Pandhal *et al.*, 2007), entre otras (Ekman *et al.*, 2006; Ran *et al.*, 2007).

La proteómica comparativa constituye una excelente herramienta no sólo para identificar y comparar fenotipos de una misma cepa ante diferentes condiciones ambientales, sino también entre una cepa y el mutante isogénico de un gen en particular (Davie & Campagnari, 2009; Koksharova *et al.*, 2007) o su variante de sobreexpresión (Lelong *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Estos estudios permiten analizar la influencia de la expresión de un gen en particular sobre el proteoma total o parcial de la célula, resultando de especial interés para genes que codifican reguladores transcripcionales o proteínas implicadas en varios mecanismos moleculares procesos fisiológicos.

2 REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN PROCARIOTAS

2.1 Metabolismo del hierro

El hierro constituye un micronutriente esencial para prácticamente todas las formas de vida en nuestro planeta. Se estima que sólo un muy reducido número de organismos bacterianos (*Lactobacillus* sp., *Borrelia burgdorferi*) carecen de requerimientos de hierro para sus funciones biológicas, dado el bajo número de átomos de hierro que contienen por célula, la ausencia de genes que codifiquen para proteínas que contengan hierro en su genoma o la no afectación de su crecimiento bajo severas condiciones de restricción de hierro (Posey & Gherardini, 2000; Weinberg, 1997).

Esta casi absoluta dependencia de hierro para la vida convirtió a este micronutriente en un elemento limitante para el crecimiento tras el cambio de la atmósfera terrestre de anoxigénica a oxigénica, lo cual determinó un predominio de la forma férrica insoluble en los ambientes con oxígeno y pH neutro. La baja biodisponibilidad del hierro obligó a los microorganismos aerobios a desarrollar mecanismos de secuestro y adquisición del hierro extracelular, conformados principalmente por compuestos secretables de bajo peso molecular y alta afinidad por Fe^{3+} denominados sideróforos (Hider & Kong, 2010; Saha *et al.*, In press). Estas moléculas de bajo peso molecular, usualmente péptidos no ribosomales, son sintetizadas y secretadas al medio extracelular en respuesta a una señal de deficiencia de hierro intracelular (Andrews *et al.*, 2003). En el entorno extracelular los sideróforos se unen con gran afinidad al hierro en su forma férrica y los complejos sideróforo- Fe^{3+} son internalizados por sistemas transportadores específicos que incluyen receptores de membrana externa de tipo TonB-dependientes (TBDT) y transportadores de membrana plasmática de tipo ABC (Andrews *et al.*, 2003; Krewulak & Vogel, 2008). Una vez en el interior celular el hierro es reducido a su forma ferrosa soluble y utilizado mayormente como cofactor en forma de hemo o grupo sulfoférrico, o incorporado a proteínas de almacenamiento como ferritinas, bacterioferritinas y proteínas Dps “*DNA-binding protein in starved cells*” (Andrews, 1998; Andrews *et al.*, 2003).

De forma similar a otros grupos bacterianos, las cianobacterias han desarrollado eficientes mecanismos de adquisición y almacenamiento de hierro, a fin de asegurar un adecuado suministro para sus funciones vitales en ambientes que usualmente presentan concentraciones limitantes o intermitentes de este micronutriente esencial. En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito la producción de diversas clases de sideróforos en respuesta a una deficiencia de hierro ambiental, incluyendo schizokinen, aerobactina y ferrioxamina B (Goldman *et al.*, 1983). La síntesis de sideróforos en *Anabaena* sp. PCC 7120 está mediada

por varias enzimas péptido-sintetasas y policétido-sintasas, las cuales se encuentran codificadas en un largo cluster de genes cuya expresión es inducida bajo condiciones limitantes de hierro (Jeanjean *et al.*, 2008). Asimismo, se han identificado al menos 22 genes para TBDTs en *Anabaena* sp. PCC 7120, seis en *Synechococcus* sp. PCC 7002, cuatro en *Synechococcus* sp. PCC 6803 y 33 de estos genes en *Gloeobacter violaceus* (Mirus *et al.*, 2009; Nicolaisen *et al.*, 2008; Stevanovic *et al.*, 2012); mientras las bacterioferritinas son responsables de almacenar hasta el 50% del contenido celular de hierro en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Keren *et al.*, 2004).

La funcionabilidad biológica del hierro dentro de la célula está determinada casi completamente por su incorporación a proteínas, ya sea como especies mono o binucleares, en forma de cluster sulfoférico (Fe-S) o como grupo hemo (Andrews *et al.*, 2003). Una variedad de proteínas y enzimas como citocromos, ferredoxina, nitrogenasa, aconitasa, NADH-deshidrogenasa, peroxidasa/catalasa y superóxido-dismutasa dependiente de hierro (Fe-SOD), entre otras, contienen a este metal en su estructura. La síntesis y/o ensamblaje de los grupos prostéticos que contienen hierro (hemo, Fe-S) requerirán rutas enzimáticas específicas. En organismos fotosintéticos como las cianobacterias, la ruta de síntesis de hemo tiene especial relevancia al formar parte de una vía biosintética más compleja, la biosíntesis de tetrapirroles, que da lugar además a la clorofila, las ficobilinas o el sirohemo (Beale, 1994).

2.2 Reguladores transcripcionales de la homeostasis del hierro

La inherente capacidad del hierro de catalizar la formación de radicales libres obliga a un estricto control de la homeostasis de este micronutriente, que garantice una adecuada disponibilidad siempre que su incorporación, utilización o almacenamiento no conlleve a un estado de estrés oxidativo (Andrews *et al.*, 2003; Cornelis *et al.*, 2011).

La incorporación, transporte, almacenamiento, y en muchos casos la utilización intracelular del hierro es regulada en función de su disponibilidad fundamentalmente a nivel transcripcional, mediante metalorreguladores que sensan las fluctuaciones fisiológicas de los niveles de Fe^{2+} libre en la célula, estimadas en $\sim 10 \mu\text{M}$ (Andrews *et al.*, 2003).

La homeostasis del hierro es mantenida en los organismos procariotas fundamentalmente mediante dos familias de metalorreguladores transcripcionales, la familia Fur (*ferric uptake regulator*) y la familia DtxR (*diphtheria toxin repressor*). La familia Fur regula el metabolismo del hierro en la mayoría de los procariotas, incluyendo bacterias Gram-negativas y en Gram-positivos con un bajo contenido GC. La familia DtxR por su parte, es protagonista en Gram-positivos con un alto contenido GC en su genoma, aunque en microorganismos como *Bacillus subtilis* o *Staphylococcus aureus*, en los que Fur controla el metabolismo del hierro, proteínas de la familia DtxR participan en la regulación de la adquisición de manganeso (Andrews *et al.*, 2003; Hantke, 2001).

En bacterias Gram-negativas pertenecientes al grupo de las proteobacterias alfa, como *Rhizobium* spp., la regulación del metabolismo del hierro ocurre mayoritariamente mediante un tercero y más recientemente estudiado metalorregulador dependiente de hierro, RirA (Johnston *et al.*, 2007; Rudolph *et al.*, 2006).

2.3 La familia Fur

2.3.1 Especialización funcional

La familia Fur agrupa a una serie de reguladores transcripcionales con características estructurales comunes que responden a diferentes señales de activación y cumplen funciones biológicas diversas dentro de la célula bacteriana, lo cual determina la subdivisión de la familia en varias subclases de proteínas (Hantke, 2001; Lee & Helmann,

2007). La subclase principal, que da nombre a la familia y se encarga básicamente de la regulación del metabolismo del hierro es Fur. La proteína Fur fue inicialmente identificada como tal en mutantes de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* que sobreexpresaban constitutivamente sideróforos y sus receptores de membrana. El estudio de estos mutantes permitió la identificación y caracterización de una proteína que actuaba como represor transcripcional, utilizaba Fe^{2+} como cofactor y regulaba la expresión de la maquinaria de adquisición de hierro en dependencia de la disponibilidad de este nutriente en el medio (Bagg & Neilands, 1987; Ernst *et al.*, 1978; Hantke, 1984). En la actualidad el número de genes *fur* descritos ha crecido exponencialmente, encontrándose procariotas expresando proteínas Fur en prácticamente todos los ambientes y grupos bacterianos. Con el advenimiento de la era genómica y postgenómica, la secuenciación y análisis de múltiples genomas han permitido predecir la existencia de homólogos de este regulador en virtualmente todas las bacterias conocidas.

Los resultados de ulteriores análisis genéticos y bioquímicos con diferentes microorganismos revelaron la enorme diversidad de las proteínas Fur, las cuales no sólo respondían a la disponibilidad de hierro, sino también a la de otros iones metálicos como Zn^{2+} , Mn^{2+} o Ni^{2+} , o a otros estímulos como el nivel intracelular de hemo o de H_2O_2 , cumpliendo en la célula diferentes cometidos (Lee & Helmann, 2007). Esto conllevó a la subdivisión de la familia Fur en otras subclases funcionales que incluyeron además las proteínas Zur (*zinc uptake regulators*), Mur (*manganese uptake regulators*), Nur (*nickel uptake regulators*), Irr (*iron response regulators*) y PerR (*peroxide stress response regulator*). La descripción de más de un homólogo o subclase Fur dentro de un mismo microorganismo ha sido un hecho comúnmente descrito (Bsat *et al.*, 1998; Hantke, 2001).

Las proteínas Zur constituyen la segunda subclase más estudiada dentro de la familia Fur (Hantke, 2005). Estas proteínas son las responsables de controlar la adquisición e

incorporación de zinc, utilizan Zn^{2+} como cofactor y han sido descritas en una gran variedad de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Maciag *et al.*, 2007), *Streptomyces coelicolor* (Shin *et al.*, 2007), *Xantomonas campestris* (Huang *et al.*, 2008), *Corynebacterium diphtheriae* (Smith *et al.*, 2009), entre otros.

Las proteínas Mur han sido descritas en *Rhizobium leguminosarum*, utilizan Mn^{2+} como cofactor y regulan la transcripción de transportadores de manganeso (Diaz-Mireles *et al.*, 2004). De forma similar a la proteína Fur de *E coli*, este regulador puede unir *in vitro* otros cationes divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} con constantes de disociación similares a Mn^{2+} (Bellini & Hemmings, 2006).

Las proteínas Nur regulan la adquisición de níquel, han sido descritas en *S. coelicolor* y utilizan Ni^{2+} como cofactor. Estas proteínas al parecer también regulan la expresión de los genes de superóxido-dismutasas, pudiendo estar implicadas no sólo en la homeostasis de níquel, sino también en la respuesta a estrés oxidativo (Ahn *et al.*, 2006).

Las proteínas Irr controlan la expresión de genes de transportadores de hierro y de otros genes dependientes de hierro no en respuesta directa a Fe^{2+} , sino en respuesta a la disponibilidad de hemo, es decir, sensan indirectamente la disponibilidad de hierro a través del estado de la biosíntesis de hemo. Este regulador se expresa en condiciones limitantes de hierro y se degrada en condiciones de suficiencia de hierro como respuesta a la unión directa con hemo. Han sido descritas en *Bradyrhizobium japonicum* (Yang *et al.*, 2006) y *R. leguminosarum* (Small *et al.*, 2009; Todd *et al.*, 2006), entre otros.

Las proteínas PerR son represores transcripcionales de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo tales como catalasas, hidropéroxido-reductasas, tiorredoxina-reductasas, entre otras. Estos reguladores constituyen sensores de H_2O_2 y utilizan Fe^{2+} o Mn^{2+} como cofactores (Hantke, 2001). La capacidad de unión al DNA de estos reguladores se reduce *in vitro* en presencia de H_2O_2 , siendo más sensible al peróxido las PerR con Fe^{2+} como

cofactor (Herbig & Helmann, 2001). En *B. subtilis* el H_2O_2 conduce a la oxidación de histidinas de PerR formando 2-oxo-histidinas, lo que previene la unión al DNA inactivando su actividad represora (Lee & Helmann, 2006a; Traoré *et al.*, 2009). Estudios en *S. aureus* indican que PerR actúa además como represor transcripcional de Fur, así como de proteínas de almacenamiento de hierro tales como ferritinas y proteínas de tipo Dps, de esta forma PerR pudiera orquestrar una respuesta global de protección frente al estrés oxidativo (Horsburgh *et al.*, 2001).

2.3.2 Unión al DNA y mecanismos de regulación

El modelo clásico de regulación propone que Fur actúa como un represor transcripcional dependiente de hierro, que regula la expresión de los genes implicados en el sistema de incorporación y transporte de hierro a la célula. Este represor en *E. coli* es un dímero conformado por monómeros de 17 kDa, cada uno con dos sitios de unión a metal: un sitio de unión a un átomo de Zn^{2+} estructural en el dominio N-terminal y un sitio de unión a un átomo de Fe^{2+} correpresor en el dominio C-terminal. En situación de abundancia de Fe^{2+} intracelular, el metal correpresor se une a Fur y promueve un cambio conformacional en la proteína permitiendo la unión al DNA en secuencias específicas de los promotores diana, impidiendo la unión de la RNA polimerasa y con ello evitando la transcripción. De forma inversa, en situación de déficit de hierro, disminuyen los niveles de Fe^{2+} intracelular y el metal correpresor se libera del represor, la proteína Fur pierde afinidad por el DNA y se separa del promotor diana permitiendo la transcripción (Escolar *et al.*, 1999).

La secuencia de unión al DNA, denominada caja Fur o “*iron box*” ha sido objeto de numerosos estudios e interpretaciones, y aun cuando en la actualidad ha logrado definirse una secuencia consenso tras el estudio de múltiples promotores regulados por Fur, la misma puede variar considerablemente en los diferentes géneros bacterianos. Los primeros

estudios de protección frente a la digestión con DNasa I (*footprinting*) con más de 30 promotores génicos que respondían a la disponibilidad de hierro, permitieron la definición de una secuencia palindrómica consenso de 19 pb (De Lorenzo *et al.*, 1987). Ensayos *in vivo* mostraron que cualquier gen heterólogo en cuyo promotor fuera incluida esta secuencia, pasaba a estar regulado por la presencia de hierro (Calderwood & Mekalanos, 1988). De esta forma, la interacción Fur-DNA parecía similar a la de los represores bacterianos clásicos, en los cuales un dímero de proteína reconoce y se une a secuencias palindrómicas (Escolar *et al.*, 1999).

Sin embargo, los resultados de otros estudios no eran compatibles con esta interpretación. Estudios de protección de Fur sobre el promotor de aerobactina frente a radicales hidroxilo revelaba un patrón de dos bases protegidas y cuatro bases no protegidas, repetido tres veces a lo largo de la secuencia de unión (De Lorenzo *et al.*, 1988a). Por otro lado, muchos promotores que respondían a hierro parecían tener no una, sino varias cajas Fur en ocasiones solapadas, mientras los experimentos de protección frente a la DNasa demostraban que Fur podía proteger una región mayor que la caja de 19 pb. Análisis por microscopía electrónica y otros estudios sugerían una oligomerización helicoidal de la proteína alrededor de la doble hélice del DNA (Frechon & Le Cam, 1994; Le Cam *et al.*, 1994). La interacción de Fur con el DNA parecía iniciarse en una secuencia de alta afinidad correspondiente a la caja Fur, que estimulaba luego la interacción con sitios secundarios de menor afinidad, de esta forma en la unión del represor eran importantes no sólo las interacciones DNA-proteína sino también las interacciones proteína-proteína. Estos resultados conllevaron a una nueva interpretación de la secuencia consenso de 19 pb, la cual no sólo constituía un palíndromo de 9 pb repetidas e invertidas, sino también podía ser la combinación de tres repeticiones adyacentes de un consenso de 6 pb (Fig. I.5) (Escolar *et al.*, 1998).

Aunque eran necesarios al menos tres motivos o hexámeros $N\text{AT}^A/\text{TAT}$ para una unión efectiva de la proteína Fur al DNA, su número total y orientación relativa no parecían importantes; de hecho fueron identificadas hasta 18 repeticiones en tándem de este hexámero en el promotor de aerobactina (Escolar *et al.*, 2000).

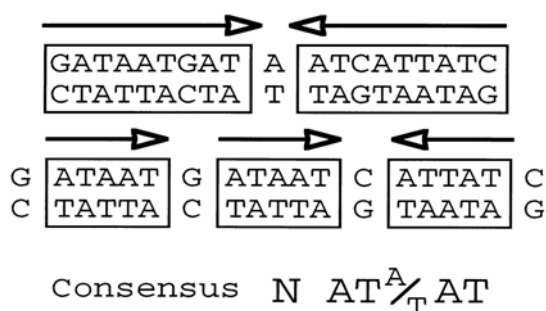


Figura I.5. Primeras interpretaciones de la caja Fur o *iron box* (Escolar *et al.*, 1999).

Posteriores reinterpretaciones de la secuencia consenso proponen las regiones de interacción con Fur como motivos solapantes de 13 pb en ambas hebras, dispuestos como “6-1-6” (Lavrrar *et al.*, 2002) (Fig. I.6A) o como motivos solapantes de 15 pb dispuestos como “7-1-7” (Baichoo *et al.*, 2002) (Fig. I.6B). Ambas interpretaciones sugieren la unión de dos dímeros de Fur en cada caja Fur, dispuestos en caras opuestas de la doble hélice sobre sitios desplazados aproximadamente media vuelta de hélice (Fig. I.6C).

Estas reinterpretaciones explicarían el fenómeno de unión cooperativa de Fur sobre el promotor y las observaciones de microscopía electrónica donde la proteína parece cubrir helicoidalmente al DNA, así como el hecho de no encontrar bases individuales esenciales para la formación del complejo Fur-DNA por experimentos de mutagénesis dirigida (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

El modelo clásico de represión transcripcional de Fur, propuesto inicialmente para la regulación de los genes implicados en el transporte de hierro en *E. coli* y basado en la

existencia de dos configuraciones de Fur en dependencia de la disponibilidad de Fe^{2+} (Escolar *et al.*, 1999), justifica la inducción de los genes diana en situaciones de deficiencia de hierro (Fig. I.7). Sin embargo, determinados genes en *E. coli* eran reprimidos y no inducidos bajo situación de estrés férrico (Dubrac & Touati, 2000), lo cual entraba en discordancia con el modelo clásico de regulación y sugería una regulación positiva de Fur.

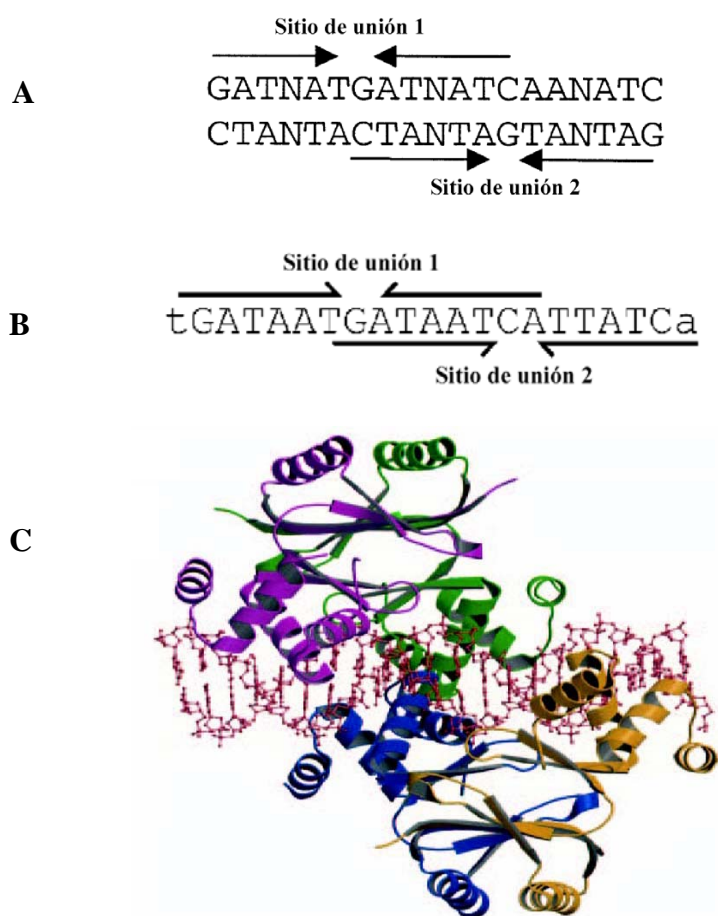


Figura I.6. Nuevas interpretaciones de la caja Fur o *iron box*. (A) Motivos solapantes de 13 pb dispuestos “6-1-6” (Lavrrar *et al.*, 2002). (B) Motivos solapantes de 15 pb dispuestos “7-1-7” (Baichoo *et al.*, 2002). (C) Esquema de la disposición de los dímeros de Fur sobre la caja Fur teniendo en cuenta estas interpretaciones (Imagen tomada de Pohl *et al.*, 2003).

Estas reinterpretaciones explicarían el fenómeno de unión cooperativa de Fur sobre el promotor y las observaciones de microscopía electrónica donde la proteína parece cubrir helicoidalmente al DNA, así como el hecho de no encontrar bases individuales esenciales para la formación del complejo Fur-DNA por experimentos de mutagénesis dirigida (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

El modelo clásico de represión transcripcional de Fur, propuesto inicialmente para la regulación de los genes implicados en el transporte de hierro en *E. coli* y basado en la existencia de dos configuraciones de Fur en dependencia de la disponibilidad de Fe^{2+} (Escolar *et al.*, 1999), justifica la inducción de los genes diana en situaciones de deficiencia de hierro (Fig. I.7). Sin embargo, determinados genes en *E. coli* eran reprimidos y no inducidos bajo situación de estrés férrico (Dubrac & Touati, 2000), lo cual entraba en discordancia con el modelo clásico de regulación y sugería una regulación positiva de Fur. El descubrimiento de un RNA antisentido (α -RNA) denominado RyhB (Masse & Gottesman, 2002), cuya expresión estaba bajo el control de Fur y que a su vez regulaba postranscripcionalmente la expresión de varios genes de ferroproteínas constituye la clave de esta regulación positiva de Fur.

RyhB es un RNA de 90 bases cuya transcripción es regulada por Fur según el mecanismo clásico de represión transcripcional. Cuando este α -RNA se transcribe induce la degradación de los RNA mensajeros (RNAm) de proteínas implicadas en el almacenamiento de hierro como ferritina y bacterioferritina (genes *ftnA* y *bfr*) y de otras proteínas que contienen hierro como la succinato-deshidrogenasa (operón *sdhCDAB*), la Fe-SOD (gen *sodB*), entre otras. En situación de abundancia de hierro Fur reprime la transcripción de este α -RNA, permitiendo la expresión de los genes antes mencionados; sin embargo, bajo condiciones de estrés férrico se induce la transcripción del α -RNA y con ello se reprime postranscripcionalmente la expresión de estos genes (Fig. I.7). Este

mecanismo de regulación permite a la célula reprimir la síntesis de proteínas de almacenamiento de hierro y otras proteínas férricas no esenciales en situación de limitación de hierro, mientras induce la expresión de genes para el secuestro y transporte de hierro extracelular, a fin de garantizar la homeostasia en una situación de estrés nutricional (Masse & Gottesman, 2002). Un mecanismo similar de regulación indirecta de Fur mediada por un α -RNA denominado NrrF ha sido igualmente descrito en *Neisseria meningitidis* (Mellin *et al.*, 2007) y *N. gonorrhoeae* (Jackson *et al.*, 2010), sobre los mismos genes regulados por RhyB en *E. coli* (bacterioferritinas, Fe-SOD, succinato deshidrogenasa, etc). En la actualidad, el papel de estas pequeñas moléculas de RNA regulatorio en el control de la homeostasis del hierro en varios organismos microbianos es un hecho reconocido (Masse *et al.*, 2007).

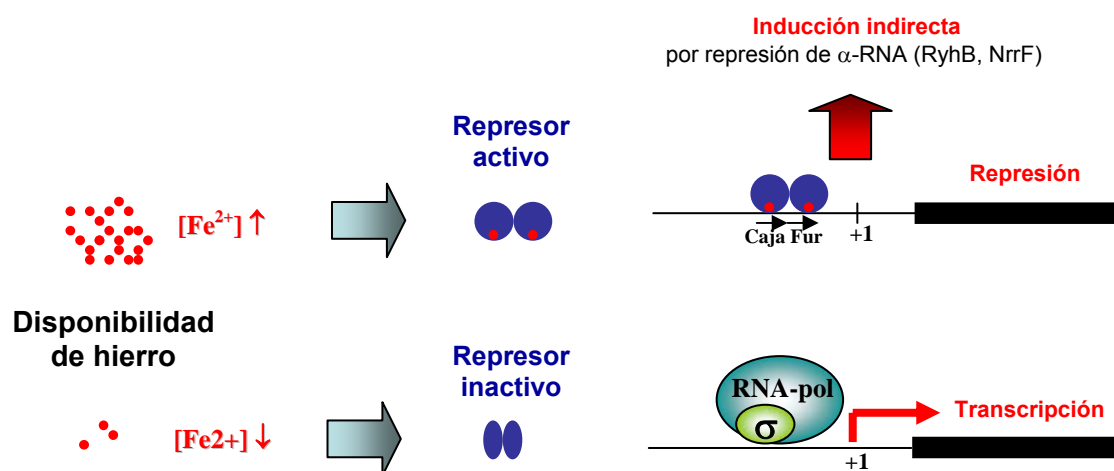


Figura I.7. Mecanismo clásico de represión transcripcional mediada por Fur

La acción de Fur como posible activador directo de la transcripción ha sido adicionalmente descrita en *N. meningitidis* (Delany *et al.*, 2004). Los autores plantean una regulación positiva de la transcripción mediada por Fur y corregulada por Fe^{2+} de los genes *norB*,

panI y *nuoA*, por unión directa de la proteína a cajas Fur ubicadas en los promotores de estos genes, sugiriendo que Fur actúa como activador o coactivador de la transcripción.

Hasta la fecha, en la inmensa mayoría de los mecanismos documentados de regulación génica mediada por Fur, ya fuera actuando como represor transcripcional clásico o como activador directo o indirecto (mediado por α -RNAs), la actividad de unión al DNA de Fur requiere la presencia de Fe^{2+} como metal correpresor. Sin embargo, varios estudios en *H. pylori* (Delany *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2005) y más recientemente en *C. jejuni* (Butcher *et al.*, 2012) evidencian la existencia de un nuevo mecanismo de regulación mediante el cual la proteína es capaz de unirse a los promotores de ciertos genes en ausencia de metal correpresor. Curiosamente, esta regulación apo-Fur ha sido propuesta para explicar la inducción mediada por Fur que tiene lugar en los genes para ferritina y Fe-SOD bajo condiciones de suficiencia de hierro. A diferencia de *E. coli* y *N. meningitidis*, la proteína Fur de *H. pylori* es capaz de reconocer y unir *in vitro* de forma específica los promotores de estos genes, lo cual sugiere un mecanismo de regulación directa; sin embargo, la unión al DNA en este caso ocurre en ausencia de Fe^{2+} e incluso la afinidad resulta seriamente afectada en presencia del metal correpresor (Ernst *et al.*, 2005). De esta forma, el nuevo modelo de regulación apo-Fur hasta ahora sólo descrito en *Helicobacter* y *Campylobacter* sugiere que Fur se une al DNA en ausencia de hierro, y que la desrepresión ocurre cuando se forma el complejo Fur- Fe^{2+} .

2.3.3 Estudios estructurales

Desde que la estructura primaria de la primera proteína Fur fue conocida, con la publicación de la secuencia del gen *fur* de *E. coli* en el año 1985 (Schaffer *et al.*, 1985), hasta la resolución de la primera estructura tridimensional por cristalografía de rayos X con la Fur de *P. aeruginosa* en el año 2003 (Pohl *et al.*, 2003), se han llevado a cabo múltiples

estudios a fin de obtener información acerca de la estructura terciaria y lograr un modelo funcional de este regulador transcripcional.

Mediante digestión con diferentes proteasas de la proteína Fur de *E. coli* y análisis de los fragmentos generados, Coy y Neilands en 1991 proponen un modelo funcional de esta proteína, en el que el extremo N-terminal participa en el reconocimiento y unión al DNA, mientras el extremo C-terminal confiere la capacidad de dimerización (Coy & Neilands, 1991). Este modelo fue confirmado más adelante mediante construcción de proteínas quiméricas formadas por cada uno de los dominios de Fur y el represor cI del fago lambda. El análisis de la capacidad de dimerización y de la regulación del gen *lacZ* controlado por un promotor reconocido por Fur, coincidía con el modelo inicial (Heidrich *et al.*, 1996; Stojiljkovic & Hantke, 1995). Estudios espectroscópicos indicaron además la presencia de dos sitios de unión a metal, un sitio de unión al metal correpresor Fe^{2+} en el dominio C-terminal, que podía ser ocupado *in vitro* por otros cationes metálicos como Mn^{2+} y Co^{2+} (Adrait *et al.*, 1999), y un segundo sitio de unión a un metal estructural en el dominio de reconocimiento al DNA, ocupado por Zn^{2+} (Althaus *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998). Asimismo, la modificación química selectiva de determinados residuos y su seguimiento por espectroscopía de masas llevaron a proponer la existencia de un motivo hélice-giro-hélice no clásico de unión al DNA en el dominio N-terminal, similar al existente en la familia DtxR. La unión del metal correpresor induciría cambios en la conformación de este motivo, permitiendo su interacción directa con el surco mayor del DNA (González de Peredo *et al.*, 2001).

Una característica notable de la secuencia primaria de las proteínas Fur es la presencia de múltiples residuos de histidina y ocasionalmente varios residuos de cisteínas (motivos $\text{H}_{3-5}\text{X}_2\text{CX}_2\text{C}$ y CX_{2-5}C). Varios estudios de mutagénesis dirigida han sido encaminados a demostrar el papel de estos residuos en la estabilidad estructural y funcional de este

regulador. Mientras que en la Fur de *E. coli* ninguno de los 12 residuos de histidina demostró estar implicado en la unión a metal (Coy *et al.*, 1994), no ocurrió lo mismo con la Fur de *B. subtilis*, donde dos residuos de histidina (H96 y H97) participan en la unión del metal correpresor (Bsat & Helmann, 1999). Del mismo modo, la sustitución de la H90 en la proteína Fur de *Vibrio cholerae* (Lam *et al.*, 1994), la H90 en la Fur de *S. typhimurium* (Hall & Foster, 1996) o la H86, H87 y H89 de *P. aeruginosa* (Barton *et al.*, 1996; Lewin *et al.*, 2002) condujo a la pérdida de la actividad biológica del regulador. En PerR de *B. subtilis*, las histidinas además de coordinar el metal regulador Fe^{2+} o Mn^{2+} , son esenciales en su papel de sensor de estrés oxidativo (Lee & Helmann, 2006a).

Las cisteínas por su parte, parecen jugar un importante papel tanto en la estructura como en la función de estos reguladores. La sustitución de dos de las cuatro cisteínas de la proteína Fur de *E. coli* (C92 y C95) condujo a la pérdida de la actividad biológica del represor (Coy *et al.*, 1994), aunque no ocurrió lo mismo al sustituir la única cisteína de la proteína Fur de *P. aeruginosa* (Lewin *et al.*, 2002). Tanto en PerR de *B. subtilis* (Traoré *et al.*, 2006) como en FurB de *M. tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007), las cisteínas participan en la coordinación del Zn^{2+} estructural. Por otro lado, el estado redox de las cisteínas también ha demostrado ser importante para la función de algunas proteínas Fur (Hernández *et al.*, 2006a; Ortiz de Orué Lucana & Schrempf, 2000).

Los estudios estructurales de las proteínas Fur han dado un salto cualitativo en los últimos años con la resolución y publicación de la estructura tridimensional de varios de estos reguladores. La técnica empleada en casi la totalidad de los casos ha sido la cristalografía de rayos X, y las coordenadas de las estructuras resueltas se encuentran en su mayoría en la base de datos RCSB Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>). De esta forma ha sido resuelta la estructura tridimensional de la proteína Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), la de PerR de *B. subtilis* (Traoré *et al.*, 2006), la de FurB de *M. tuberculosis* (Lucarelli *et*

al., 2007), la del dominio N-terminal de Fur de *E. coli*, también analizada por resonancia magnética nuclear (Pecqueur *et al.*, 2006), así como las estructuras cristalográficas de las proteínas Fur de *V. cholerae* (Sheikh & Taylor, 2009), *H. pylori* (Dian *et al.*, 2011) y *C. jejuni* (Butcher *et al.*, 2012).

Todas estas estructuras, aún con diferencias en su disposición espacial, concuerdan con el modelo inicialmente propuesto para las proteínas de la familia Fur. Todas son proteínas dimericas, donde cada monómero está conformado por dos dominios distinguibles: un dominio N-terminal con motivo hélice-giro-hélice de unión al DNA, y un dominio C-terminal de dimerización por donde interactúan ambos monómeros (Fig. I.8).

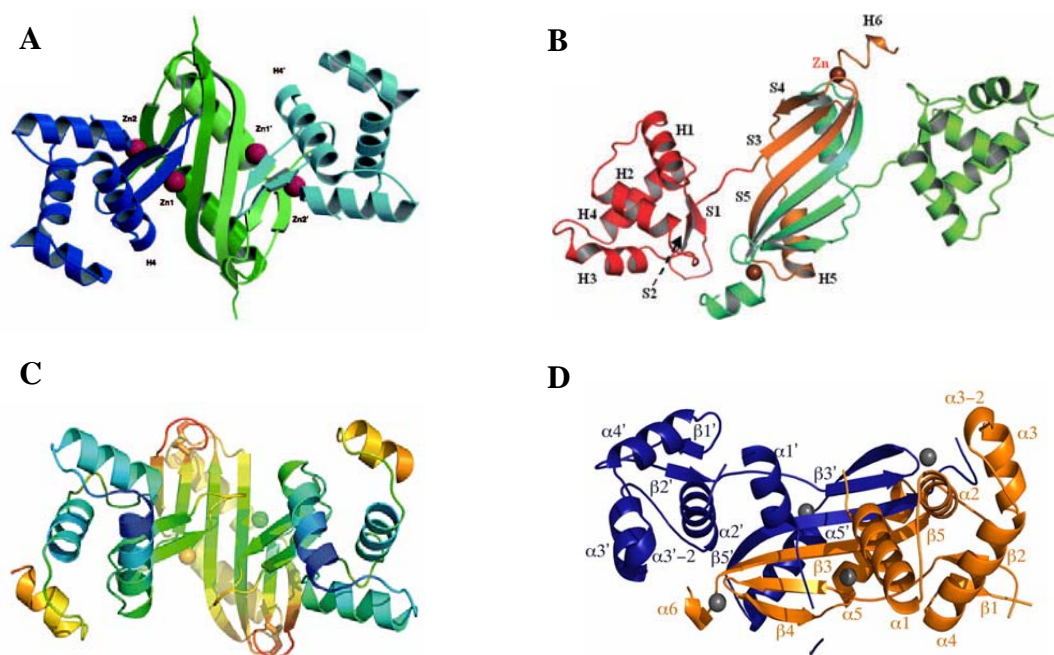


Figura I.8. Diagramas de la estructura tridimensional de algunas de las proteínas de la familia Fur resueltas por cristalografía de rayos X. (A) Dímero de la proteína Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003). (B) Dímero de la proteína PerR de *B. subtilis* (Traoré *et al.*, 2006). (C) Dímero de la proteína Fur de *V. cholerae* (Sheikh & Taylor, 2009). (D) Dímero de la proteína Fur de *C. jejuni* (Butcher *et al.*, 2012).

2.3.4 Fur como regulador global de la transcripción

Fur constituye un regulador global de la transcripción en procariotas. Aunque la primera función fisiológica descrita para esta proteína y la más compartida entre los diferentes organismos que la contienen consiste en la regulación de la expresión de los genes implicados en la adquisición y transporte de hierro (Andrews *et al.*, 2003; Cornelis *et al.*, 2009; Hantke, 2001; Lee & Helmann, 2007; McHugh *et al.*, 2003), la acción de Fur influye además, directa o indirectamente en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos en la célula. Varios resultados experimentales avalan la participación de Fur en la expresión de genes implicados en el almacenamiento de hierro (Bereswill *et al.*, 2000; Cornelis *et al.*, 2009; Masse & Gottesman, 2002), en la defensa frente al estrés oxidativo (Dubrac & Touati, 2000; Hassett *et al.*, 1996; Masse & Gottesman, 2002), en el metabolismo intermediario (Cunningham *et al.*, 1997; Masse & Gottesman, 2002; Stojiljkovic *et al.*, 1994), en el metabolismo energético (Andrews *et al.*, 2003; Vassinova & Kozyrev, 2000), en la expresión de factores de virulencia (Ellermeier & Schlauch, 2008; Jacobsen *et al.*, 2005; Mey *et al.*, 2005), en la motilidad y quimiotaxis (Campoy *et al.*, 2002; Stojiljkovic *et al.*, 1994), en la defensa frente a estrés ácido (Bijlsma *et al.*, 2002; Hall & Foster, 1996; Yang *et al.*, 2008), entre otros procesos.

Sólo en *E. coli* han sido identificados más de 100 genes regulados por Fur (McHugh *et al.*, 2003), 20 operones en *B. subtilis* (Baichoo *et al.*, 2002), al menos 59 genes en *H. pylori* (Danielli *et al.*, 2006), 34 operones en *Yersinia pestis* (Gao *et al.*, 2008) y 95 genes en *C. jejuni* (Butcher *et al.*, 2012). Asimismo, se estima que el 10% de los genes presentes en todo el genoma de *N. gonorrhoeae* cambian su expresión en dependencia de la disponibilidad de hierro, siendo un 30% de estos genes directamente regulado por Fur (Ducey *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010). La complejidad de los regulones Fur se incrementa notablemente en aquellos casos donde el metalorregulador modula

directamente la expresión de otros reguladores transcripcionales (Ducey *et al.*, 2005; López-Gomollón *et al.*, 2007a; Teixido *et al.*, 2010), de esta forma, Fur controla directa o indirectamente la expresión de genes implicados en diversas categorías funcionales.

Varios métodos han sido empleados para la identificación de genes regulados por Fur, tales como el ensayo FURTA (*Fur titration assay*) (Jackson *et al.*, 2010; Stojiljkovic *et al.*, 1994; Tsohis *et al.*, 1995), la técnica de selección cíclica SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (Ochsner & Vasil, 1996), la técnica de retardo en gel EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) (Gao *et al.*, 2008; Hellman & Fried, 2007) o la predicción bioinformática y ulterior verificación experimental (Ahmad *et al.*, 2009; Pich *et al.*, 2012; Quatrini *et al.*, 2007).

El uso de técnicas de análisis global de la expresión génica y proteica, tales como *microarrays* o electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, aplicadas al estudio de diferentes condiciones ambientales o la comparación de estirpes mutantes y silvestres han permitido un importante avance en la caracterización del regulón Fur en diferentes microorganismos (Butcher *et al.*, 2012; Grifantini *et al.*, 2003; Lelong *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). La generación de mutantes permite estudiar la influencia del gen inactivado, analizando el fenotipo de la estirpe mutante y su patrón de expresión génica en comparación con la estirpe silvestre. Sin embargo, en algunos microorganismos la generación de mutantes de delección del gen *fur* no ha sido posible, sugiriendo un papel esencial de este regulador, tal es el caso de *P. aeruginosa* (Vasil & Ochsner, 1999); *Haemophilus parasuis* (Bigas *et al.*, 2006) o *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2006b). En estos casos, la creación de estirpes de sobreexpresión del gen regulador constituye una herramienta alternativa para la caracterización del regulón (Battisti *et al.*, 2007; Ellermeier & Slauch, 2008; Wang *et al.*, 2008).

2.3.5 Regulación de Fur

Fur es una proteína muy abundante en la célula, algo especialmente sorprendente tratándose de un regulador génico. A modo de ejemplo, podemos comparar las 10-20 copias por célula de LacI o las 50-300 de TrpR (Hantke, 2001), frente a las 2500 copias de Fur cuantificadas en *V. cholerae* en fase logarítmica, que aumentan a 7500 en fase estacionaria (Watnick *et al.*, 1997), o las 10000 - 40000 copias estimadas en *P. aeruginosa* (Vasil & Ochsner, 1999). Esta alta concentración contrasta con la de otros reguladores, lo que se justifica por el amplio regulón que controla y por la forma inusual en que la proteína se une al DNA, si bien no se descarta que pueda desempeñar algún otro papel adicional en la célula más allá de su actividad como metalorregulador transcripcional (López-Gomollón *et al.*, 2009).

Hasta la fecha se han descrito mecanismos de regulación de Fur a tres niveles: transcripcional, postranscripcional y postraducciona

A nivel transcripcional, la expresión de Fur está autorregulada en numerosos organismos (De Lorenzo *et al.*, 1988b), aunque también, en menor número, se han descrito organismos donde Fur no está autorregulada (Park *et al.*, 2001). Asimismo, la transcripción del gen *fur* puede estar influenciada por otros reguladores como OxyR y SoxRS en *E. coli* (Zheng *et al.*, 1999) o NtcA en *Anabaena* sp. (López-Gomollón *et al.*, 2007b).

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito la existencia de un α -RNA resultado de la transcripción dicistrónica del gen adyacente a *furA*, situado en sentido opuesto (*tail-to-tail*), junto con la secuencia complementaria al gen *furA*. La interrupción de este α -RNA conllevó a un incremento moderado de los niveles de FurA, por lo que el mismo pudiera constituir un mecanismo de regulación postranscripcional de Fur en la célula. El RNA dicistrónico formaría un dúplex con el RNAm de *furA* promoviendo su degradación e impidiendo la traducción (Hernández *et al.*, 2006b). Este tipo de regulación

postranscripcional de Fur mediada por α -RNA parece conservada en varias especies de cianobacterias (Sevilla *et al.*, 2011).

Se han propuesto al menos dos mecanismos de regulación postraduccional de Fur basados en la inhibición de su capacidad de unión al DNA por interacción con hemo (Hernández *et al.*, 2004b; Smith *et al.*, 1996) o por la nitrosilación del hierro correpresor (D'Autreaux *et al.*, 2002).

3 REGULACIÓN MEDIADA POR FUR EN CIANOBACTERIAS

3.1 Proteínas Fur en cianobacterias

La influencia del hierro sobre el crecimiento y la fisiología de las cianobacterias, así como los cambios en la expresión génica que tienen lugar en estos microorganismos como respuesta a un estrés férrico u oxidativo han sido extensamente estudiados (Ferreira & Strauss, 1994; Hihara *et al.*, 2003; Kupper *et al.*, 2008; Latifi *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2007; Singh & Sherman, 2000; Singh *et al.*, 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan estos cambios en la expresión génica y garantizan la homeostasis han sido pobremente atendidos.

El primer estudio sobre proteínas Fur en cianobacterias fue llevado a cabo por Ghassemian y Strauss en 1996 en *Synechococcus* sp. PCC 7942. Mediante ensayos de represión *in vivo* en *E. coli* empleando un gen reportero fusionado al promotor del gen *isiA* de *Synechococcus*, analizaron la represión obtenida al transformar la cepa de *E. coli* con una librería cromosómica de *Synechococcus* obtenida por digestión con la enzima *Sau3AI*. El estudio permitió la identificación de un marco abierto de lectura que codificaba para una proteína de 147 aminoácidos, con un 36% de homología a la proteína Fur de *E. coli*. A diferencia de la propia Fur de *E. coli* y de otras bacterias heterotróficas, la nueva proteína Fur identificada en *Synechococcus* parecía jugar un papel esencial para la fisiología de la

cianobacteria siendo imposible la obtención de mutantes con la totalidad de las copias del gen *fur* delecionadas en el genoma poliploide de la cianobacteria (Ghassemian & Straus, 1996).

En 1996 también se produce la secuenciación completa del primer genoma de un organismo fotoautotrófico, la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996). El advenimiento de la era genómica y postgenómica facilitó sustancialmente el estudio de las bases moleculares de diferentes procesos celulares, permitiendo a las cianobacterias convertirse en modelos de estudio para procesos como la fotosíntesis, la diferenciación celular o la fijación de nitrógeno. En la actualidad se conoce la existencia de ortólogos Fur en la totalidad de las especies de cianobacterias cuyos genomas han sido secuenciados (Botello-Morte *et al.*, In press). Sin embargo, sólo existen reportes de estudios funcionales de proteínas Fur en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Li *et al.*, 2004; Shcolnick *et al.*, 2009), *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Ghassemian & Straus, 1996; Michel & Pistorius, 2004), *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Martin-Luna *et al.*, 2006a; Martin-Luna *et al.*, 2006b) y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2004a; Hernández *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009; López-Gomollón *et al.*, 2007a; López-Gomollón *et al.*, 2009; Napolitano *et al.*, 2012).

En *Synechocystis* sp. PCC 6803, el regulador PerR es inducido bajo situación de estrés oxidativo, funciona como un represor transcripcional autorregulable y modula la expresión de una gran variedad de genes (Li *et al.*, 2004), incluyendo las proteínas inducibles bajo estrés férrico IsiA e IdiA (Michel & Pistorius, 2004), la peroxirredoxina AhpC (Kobayashi *et al.*, 2004) y la proteína de tipo Dps, MrgA (Shcolnick *et al.*, 2007; Shcolnick *et al.*, 2009).

En *S. elongatus* PCC 7942, la proteína Fur reprime la transcripción de IsiA bajo condiciones de suficiencia de hierro (Michel & Pistorius, 2004); mientras en *M.*

aeruginosa PCC 7806, Fur participa en la regulación de la expresión de los genes implicados en la síntesis de microcistinas (Martin-Luna *et al.*, 2006b).

El análisis de la secuencia genómica de *Anabaena* sp PCC 7120 condujo a la identificación de tres marcos abiertos de lectura que contenían la secuencia H₂XHX₂CX₂C, altamente conservada en proteínas Fur, que se corresponden con las secuencias génicas *all1691*, *all2473* y *alr0957* descritas en la Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). Los tres productos génicos, denominados FurA, FurB y FurC, respectivamente (Hernández *et al.*, 2004a), aunque poseen las características propias de la familia Fur, tienen secuencias muy diferentes, lo que probablemente implica funciones diferentes en la célula, algo comúnmente descrito en microorganismos con más de un homólogo Fur (Bsat *et al.*, 1998; Hantke, 2001; Lee & Helmann, 2007).

La proteína FurA (gen *all1691*) comparte la mayor homología con las proteínas Fur de bacterias heterotróficas, está constituida por 152 aminoácidos, tiene un peso molecular de 17,5 kDa, un punto isoeléctrico de 6,9 y un coeficiente de extinción molar teórico de 12690 M⁻¹cm⁻¹; contiene en su secuencia 5 cisteínas y 12 histidinas. Los estudios funcionales sugieren que este metalorregulador se comporta como un regulador global de la transcripción, controlando no sólo el metabolismo del hierro, sino además modulando la expresión de una variedad de genes de diversas categorías funcionales (Hernández *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2007; López-Gomollón *et al.*, 2007a).

Por su parte FurB (gen *all2473*) contiene 132 aminoácidos, un peso molecular de 15,2 kDa, un punto isoeléctrico de 8,7 y un coeficiente de extinción molar teórico de 5720 M⁻¹cm⁻¹; presenta 5 cisteínas y 7 histidinas y comparte un 45% de homología y un 26% de identidad con FurA. Recientemente se ha identificado a este regulador como una proteína Zur (Napolitano *et al.*, 2012). Algunos estudios sugieren que esta proteína pudiera cumplir

además un papel protector del DNA bajo condiciones de estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009).

Finalmente, FurC (gen *alr0957*) tiene 149 aminoácidos, un peso molecular de 17,4 kDa, un punto isoeléctrico de 5,3 y un coeficiente de extinción molar teórico de $13730 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; presenta 3 cisteínas y 6 histidinas y comparte un 34% de homología y un 18% de identidad con FurA. Poco se conoce sobre el papel de FurC en la fisiología de *Anabaena* sp. Aunque la proteína se induce bajo situación de estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009), hasta la fecha no existen evidencias de su participación directa o indirecta en un mecanismo de defensa frente a este tipo de estrés. Estudios *in vitro* sugieren un posible papel cooperativo o regulatorio sobre la acción de FurA y FurB. Ensayos de retardo en gel demostraron que tanto FurA como FurB se unen a las regiones promotoras de los tres reguladores, no así FurC, que no reconoce secuencias de unión en ninguno de los tres promotores. Sin embargo, la presencia de FurC afectó la capacidad de unión de cada uno de sus homólogos a sus respectivas secuencias dianas, potenciando la unión de FurA e inhibiendo la de FurB, pudiendo indicar una posible coordinación o efecto combinado en la cascada de regulación (Hernández *et al.*, 2004a).

3.2 Antecedentes en la caracterización bioquímica y funcional de FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120

3.2.1 Propiedades físico-químicas

La proteína FurA de *Anabaena* sp. fue inicialmente descrita en la cepa PCC 7119 (Bes *et al.*, 2001) y posteriormente en la cepa PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2004a). Dada su similitud genética, la proteína es idéntica en ambas cepas.

La proteína ha sido clonada, sobreexpresada en *E. coli* y usualmente purificada mediante IMAC (*Immobilized metal affinity chromatography*) aprovechando su propia secuencia de

poli-histidinas. La cromatografía de afinidad a metal se realiza preferentemente con zinc en lugar de níquel, dado que este último ha permitido menores rendimientos en la purificación de FurA y mayor número de impurezas. Una vez purificada la proteína no puede ser concentrada a pH neutro o básico debido a una marcada precipitación, lo cual no ocurre tras dializar con 10 mM de acético/acetato pH 4 (Hernández *et al.*, 2002) o si purificamos en presencia de bajas concentraciones de cloruro de guanidinio y luego dializamos en acético/acetato (Pellicer *et al.*, 2010). La proteína recombinante purificada mediante IMAC-Zn²⁺ o IMAC-Ni²⁺ no mostró ningún contenido de metales tras su análisis mediante espectrometría de masas (Hernández *et al.*, 2002), lo cual resulta de particular interés dada la común existencia de Zn²⁺ estructural en los miembros de la familia Fur (Lucarelli *et al.*, 2007; Pecqueur *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2003; Traoré *et al.*, 2006).

Tras su purificación, FurA recombinante dimeriza en solución en ausencia de agentes reductores como DTT o 2-mercaptoetanol, mientras la presencia de agentes oxidantes como diamida incrementan la formación de otros estados oligoméricos como trímeros, tetrámeros o pentámeros en una proporción dependiente de la concentración de proteína, sugiriendo la ocurrencia de puentes disulfuro intercatenarios. La oligomerización no es totalmente reversible y su ocurrencia es influenciada además por la concentración de sales, lo cual sugiere también la participación de interacciones hidrofóbicas (Hernández *et al.*, 2002).

3.2.2 Reconocimiento y unión al DNA

Ensayos de retardo en gel demostraron que FurA recombinante era capaz de unirse de forma específica a su propio promotor y al promotor de la flavodoxina (*isiB*) en presencia de Mn²⁺ y esta unión era inhibida con la adición de un agente quelante como EDTA (Bes *et al.*, 2001). Estudios ulteriores demostraron que la interacción de FurA con el DNA era

influenciada además por el estado redox de sus cisteínas, siendo favorecida sustancialmente con la presencia de un agente reductor como DTT e inhibida por H₂O₂ o diamida, lo cual pudiera sugerir que las condiciones redox *in vivo* pudieran modular la interacción del Fur con el DNA en *Anabaena* sp. (Hernández *et al.*, 2006a).

La proteína FurA recombinante muestra una capacidad de unión al grupo hemo en el rango de concentración micromolar, esta unión es saturable y en una proporción molar de 1:1 a pH 8 (Hernández *et al.*, 2004b). La interacción con el grupo hemo afecta sensiblemente la unión del represor a sus promotores diana en ensayos de retardo en gel, lo cual pudiera constituir la base molecular de un posible mecanismo de regulación postraducciona de FurA. Las características físico-químicas de la unión del grupo hemo a FurA sugieren que el metalorregulador pudiera funcionar como una proteína sensora de hemo en la célula (Pellicer *et al.*, 2012).

Análisis de protección frente a la acción de la DNasa I o *footprinting* con los promotores de los genes *isiB* y *furA* indicaron que FurA protegía dos sitios o regiones en cada promotor, las cuales podían subdividirse en agrupaciones de varios motivos consecutivos ricos en A/T (Hernández *et al.*, 2006a). El alineamiento de cada una de estas regiones protegidas con la secuencia consenso de 19 pb propuesta para *E. coli* mostró una identidad entre el 42 y 58%, aunque permitiendo sustituciones A/T esta identidad podía incrementarse considerablemente (Hernández *et al.*, 2006a). Sin embargo, la escasa homología entre las cuatro secuencias de unión encontradas en los dos promotores de la cianobacteria no dejaba claro una secuencia consenso de unión de FurA a sus promotores diana, más allá del reconocimiento de una secuencia claramente rica en residuos de A/T. Algunos estudios sugieren que la arquitectura de la *iron box* es más importante que la identidad de bases individuales en la afinidad del Fur por el DNA (Lavrrar *et al.*, 2002). Para algunos microorganismos como *H. pylori*, no se ha logrado definir una secuencia

consenso de unión del regulador Fur al DNA (Carpenter *et al.*, 2009). Las diferencias en los sitios de unión del represor pudieran responder a las diferencias existentes en la secuencia aminoacídica del motivo hélice-giro-hélice del dominio N-terminal de Fur en los diferentes microorganismos, el cual reconoce e interactúa directamente con el surco mayor del DNA (González de Peredo *et al.*, 2001).

3.2.3 Regulación de FurA

La regulación de FurA está sujeta al parecer a diferentes mecanismos. Hasta el momento han sido encontradas evidencias de que la expresión de FurA es regulada a nivel transcripcional por ella misma (Bes *et al.*, 2001) y por el regulador NtcA (López-Gomollón *et al.*, 2007a), postranscripcionalmente por el α -RNA dicistrónico *alr1690- α -furA* (Hernández *et al.*, 2006b) y quizás su actividad y/o concentración pudiera modularse a nivel postraduccional mediante el estado redox de sus cisteínas (Hernández *et al.*, 2006a) o por la interacción con el grupo hemo (Hernández *et al.*, 2004b).

Los niveles de FurA aumentan considerablemente en proheterocistos y heterocistos maduros (López-Gomollón *et al.*, 2007b), lo cual pudiera indicar un papel relevante de este metalorregulador en el proceso de diferenciación o en la propia fisiología del heterocisto. Asimismo, los niveles de FurA se incrementan ligeramente durante la exposición del microorganismo a estrés férrico (Hernández *et al.*, 2002) u oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009).

3.2.4 Estudios previos en la definición del regulón

Tradicionalmente el análisis global comparativo de transcriptomas y/o proteomas entre mutantes de delección de *fur* y sus estirpes silvestres parentales ha permitido la definición o caracterización de los regulones Fur en bacterias heterotróficas (Baichoo *et al.*, 2002; Gao

et al., 2008; McHugh *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004). Varios intentos por obtener un mutante de delección del gen *furA* mediante eventos de doble recombinación han resultado insatisfactorios (Hernández *et al.*, 2006b). En ninguno de los casos se lograron obtener exconjugantes con una completa segregación y la totalidad de las copias del gen en todos los cromosomas interrumpidas, lo cual pudiera sugerir un papel esencial de este regulador en *Anabaena* sp, de forma análoga a lo que ocurre con proteínas Fur en otros microorganismos (Bigas *et al.*, 2006; Ghassemian & Straus, 1996; Vasil & Ochsner, 1999). A pesar de este inconveniente práctico, algunos avances se han llevado a cabo en la definición del regulón FurA de *Anabaena* sp. Los estudios en tal sentido han permitido la identificación de varios genes cuyos promotores son reconocidos *in vitro* por FurA mediante ensayos de retardo en gel. Además de su autorregulación, FurA se une de forma específica al promotor de la flavodoxina (Bes *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2006a), a los promotores de otros análogos Fur en *Anabaena* sp. como FurB y FurC (Hernández *et al.*, 2004a), al promotor de un análogo en *Anabaena* sp. de la proteína DpsA de *Synechococcus* sp. (Hernández *et al.*, 2007), al promotor del regulador global del metabolismo del nitrógeno NtcA y a un variado número de genes corregulados por ambos reguladores (López-Gomollón *et al.*, 2007a), entre otros.

OBJETIVOS

Tomando como base los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación sobre el papel regulador de la proteína FurA en la fisiología de las cianobacterias, nos propusimos en este trabajo de tesis contribuir a la definición del regulón FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120, prestando especial interés en la posible implicación de este metalorregulador en la modulación de mecanismos moleculares propios de las cianobacterias, no descritos con anterioridad en bacterias heterótrofas.

Objetivo General:

Identificar nuevas funciones de las proteínas Fur en cianobacterias mediante el estudio del regulón FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120

Objetivos específicos:

- Construir una estirpe de sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. como herramienta para el estudio del regulón.
- Analizar los posibles cambios fenotípicos que tengan lugar en la cianobacteria, tanto morfológicos como fisiológicos y moleculares, asociados a la sobreexpresión del regulador transcripcional FurA.
- Identificar los cambios de la expresión génica en la estirpe de sobreexpresión que son consecuencia directa de la acción de FurA.
- Estudiar el papel regulador de FurA en el metabolismo del hierro.
- Analizar la influencia de FurA en el proceso de diferenciación a heterocistos.
- Definir una secuencia reguladora consenso o “caja FurA” que gobierne la unión del regulador a sus promotores diana en *Anabaena* sp.

CAPÍTULO 1

Obtención y caracterización fenotípica de una estirpe de sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120

González A, Bes T, Barja F, Peleato ML, Fillat MF.
Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator
involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology.
***Plant and Cell Physiology* 2010; 55 (11): 1900-1914.**

1.1 ABSTRACT

Previous genomic analyses of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 have identified three ferric uptake regulator (Fur) homologs with low sequence identities and probably different functions in the cell. FurA is a constitutive protein that shares the highest homology with Fur from heterotrophic bacteria and appears to be essential for *in vitro* growth. In this study, we have analysed the effects of FurA overexpression on the *Anabaena* sp. phenotype and investigated which of the observed alterations were directly operated by FurA. Overexpression of the regulator led to changes in cellular morphology, resulting in shorter filaments with rounded cells of different sizes. The *furA*-overexpressing strain showed a slower photoautotrophic growth and a marked decrease in the oxygen evolution rate. Overexpression of the regulator also decreased both catalase and superoxide dismutase activities, but did not lead to an increase in the levels of intracellular reactive oxygen species. By combining phenotypic studies, reverse transcription-PCR analyses and electrophoretic mobility shift assays, we identified three novel direct targets of FurA, including genes encoding a siderophore outer membrane transporter (*schT*), bacterial actins (*mreBCD*) and the PSII reaction center protein D1 (*psbA*). The affinity of FurA for these novel targets was markedly affected by the absence of divalent metal ions, confirming previous evidence of a critical role for the metal co-repressor in the function of the regulator *in vivo*. The results unravel new cellular processes modulated by FurA, supporting its role as a global

1.2 INTRODUCTION

Iron is a scarce nutrient essential for almost all organisms. However, an excess of free iron in the cell is potentially toxic under aerobic conditions due to its ability to catalyze the formation of active species of oxygen by Fenton reactions (Andrews *et al.*, 2003). Bacteria

tightly regulate their iron metabolism by a predominant regulatory system orchestrated by the ferric uptake regulator (Fur), which controls the expression of iron uptake and storage machinery in response to iron availability (Escobar *et al.*, 1999). The classical model of Fur regulation describes this protein as a sensor of the intracellular free iron concentration, that binds to Fe^{2+} under iron-rich conditions and acts as an active repressor by binding to “iron boxes”, located in the promoters of iron-responsive genes. Under iron-restricted conditions, the equilibrium is displaced to release Fe^{2+} and the repressor becomes inactive, allowing the transcription of target genes. Additionally, transcription of several genes has been shown to be directly or indirectly up-regulated by Fur, involving a variety of mechanisms (Masse & Gottesman, 2002; Delany *et al.*, 2004). Fur proteins are considered global transcriptional regulators in prokaryotes. The Fur regulons so far identified include not only iron assimilation genes, but also a large number of genes and operons involved in many cellular processes such as respiration, redox stress resistance, glycolysis and the tricarboxylic acid cycle, methionine biosynthesis, purine metabolism, chemotaxis and synthesis of virulence factors, phage-DNA packaging, etc. Around 100 genes are regulated by Fur in *Escherichia coli* (McHugh *et al.*, 2003), 59 genes in *Helicobacter pylori* (Danielli *et al.*, 2006), 34 operons in *Yersinia pestis* (Gao *et al.*, 2008) and 20 operons in *Bacillus subtilis* (Baichoo *et al.*, 2002). Usually, more than one Fur homolog with different functions has been identified in the same microorganism (Bsat *et al.*, 1998).

Cyanobacteria are widely distributed phototrophic prokaryotes that carry out oxygenic photosynthesis. As photosynthetic organisms, cyanobacteria particularly need iron for photosystem complexes and soluble proteins; but, on the other hand, they are exposed to the production of reactive oxygen species (ROS) concomitant with photosynthesis (Latifi *et al.*, 2009). Therefore, regulation of iron metabolism in cyanobacteria must be

particularly important, and Fur proteins could be involved in the control of new pathways not previously described in heterotrophic microorganisms.

The genomic analysis of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 led to the identification of three Fur homologs, named FurA, FurB and FurC, corresponding to the CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) open reading frames *all1691*, *all2473* and *alr0957*, respectively (Hernández *et al.*, 2004a). The three proteins share typical Fur motifs, but are only distantly related. While FurA shares 40-45% homology with most well-known members of the Fur family, there have been few functional or structural characterizations of Fur members with close sequence homology to FurB or FurC. Western blot analyses of crude cellular extracts of *Anabaena* sp. have shown that FurA is a constitutive protein, whose expression slightly increases under iron deficiency (Hernández *et al.*, 2002). Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) have shown that FurA binds the three *fur* homolog promoters, as well as those of genes involved in a variety of functions including photosynthesis and defense against oxidative stress (Bes *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2004a; Hernández *et al.*, 2007; López-Gomollón *et al.*, 2007a). Divalent metal ions and thiol-reducing agents enhance the affinity of FurA for its target DNA sequences *in vitro*, suggesting the importance of the metal co-repressor and the redox status of the cysteines for the interaction with DNA *in vivo* (Hernández *et al.*, 2006a). Attempts to inactivate *furA* have resulted in only a partial segregation of the mutated chromosomes, suggesting an essential role for this protein under standard culture conditions (Hernández *et al.*, 2006b).

Overexpression of transcriptional regulators has been previously used in *Anabaena* sp. (Buikema and Haselkorn, 2001; Liu and Golden, 2002; Wu *et al.*, 2004; Olmedo-Verd *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007) and other bacteria (Marr *et al.*, 2006; Ellermeier and Slauch, 2008; Wang *et al.*, 2008) as a tool to unravel the mechanisms of gene regulation and to

identify direct DNA targets in complex regulatory networks. In order to gain new insights into the cellular functions of FurA, we have constructed a strain of *Anabaena* sp. that exhibits a high level of overexpression of this transcriptional regulator, and have analyzed some effects of such a level of FurA on various aspects of the cyanobacterial phenotype. We then investigated which of the observed phenotypic changes were the result of a direct FurA modulation of gene expression. This overexpression approach led us to identify three novel direct targets of FurA involved in different cellular processes in *Anabaena* sp.

1.3 MATERIALS AND METHODS

1.3.1 Strains and culture conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1.1. Wild-type *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and its *furA*-overexpressing derivative strain AG2770FurA were grown photoautotrophically at 30°C in BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979), supplemented with neomycin (Nm) 50 µg ml⁻¹ in the case of strain AG2770FurA. For most experiments the strains were cultured in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 60 ml of culture medium. The cultures were maintained in an incubator shaker at 120 rpm under continuous illumination with white light at 20 µE m⁻² s⁻¹.

For overexpression phenotype screening after conjugation, clones of exconjugant *Anabaena* sp. resistant to Nm were grown photoautotrophically in BG-11 medium supplemented with 50 µg ml⁻¹ Nm to an optical density of 0.3 at 750 nm, then a filter-sterilized solution of CuSO₄ was added to BG-11 medium to a final concentration of 0.4 µM, in order to induce the *petE* promoter (Buikema and Haselkorn, 2001), and cultures were further incubated for 72 h under standard growth conditions.

Table 1.1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻ , for cloning and maintaining plasmids	Invitrogen
ED8654	F ⁻ <i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻) <i>recA 56 lac-3 o lacY1 galK2 galT22</i> <i>glnV44 supF58 metB1 hsdR514</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>trpR55</i> , for triparental conjugation	Institute of Plant Biochemistry and Photosynthesis, Seville, Spain
CPB1893	<i>mcrA</i> ⁻ <i>mcrB</i> ⁻ M. <i>EcoK</i> ⁺ R. <i>EcoK</i> ⁻ , for triparental conjugation	Institute of Plant Biochemistry and Photosynthesis, Seville, Spain
BL21(DE3)	<i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3), for expression and purification of recombinant FurA	EMD Biosciences
<i>Anabaena</i> sp.		
PCC 7120	Wild-type	Pasteur Institute, Paris, France
AG2770FurA	PCC 7120 harboring pAM2770FurA, overexpresses FurA	This study
Plasmids		
pGEM-T	Cloning vector, Amp ^r	Promega
pAM2770	Shuttle vector, Km ^r /Nm ^r	Lee <i>et al.</i> , 2003
pAM2770FurA	pAM2770 containing <i>furA</i> expressed from <i>petE</i> promoter	This study
pRL443	Conjugal plasmid; Amp ^r Tc ^r ; Km ^s derivative of RP-4	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pRL623	Conjugation helper plasmid; Cm ^r ; Mob _{ColK} , M. <i>AvaII</i> , M. <i>Eco47II</i> , M. <i>EcoT221</i>	Elhai <i>et al.</i> , 1997
pET28a	Expression vector, Km ^r	EMD Biosciences

Escherichia coli strains carrying plasmids were grown in Luria broth supplemented, as appropriate, with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin (Km), 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin (Amp) and/or 34 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol (Cm).

1.3.2 Nucleic acid manipulations

Total DNA and RNA from *Anabaena* sp. strains growing exponentially were isolated as described previously (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Plasmid preparations were performed using the GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma). DNA purification of PCR products was performed using the GFX™ PCR DNA and the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Standard protocols were used for cloning, *E. coli* transformation and PCR (Sambrook & Russell, 2001).

Plasmid pAM2770FurA, which contains a copy of the *furA* gene under the control of the *Anabaena* sp. PCC 7120 copper-inducible *petE* (plastocyanin) promoter, was constructed from the shuttle vector pAM2770 (Lee *et al.*, 2003), a kind gift from Dr. James W. Golden (Texas A&M University, College Station, TX, USA). The entire coding region of *furA* was amplified by PCR using the primers 2770FurA_up and FurA_dw (Table 1.2), and genomic DNA from strain PCC 7120 as template. The PCR product was cloned into vector pGEM-T (Promega), digested with *Nde* I and *Bam* HI, and cloned into the same restriction sites of vector pAM2770. The construct was partially sequenced to ensure that no modifications in the nucleotide sequence occurred during amplification and cloning.

1.3.3 Construction of a *furA*-overexpressing strain

Plasmid pAM2770FurA was transferred to *Anabaena* sp. PCC 7120 by conjugation according to a previously described method (Elhai *et al.*, 1997). Triparental mating was carried out using the *E. coli* conjugal donor strain ED8654, which contains the plasmid pRL443, and the *E. coli* conjugal helper strain CPB1893 carrying the plasmid pRL623. Clones resistant to Nm were screened by Western blotting in order to evaluate the copper-inducible overexpression of FurA. Finally, the clone selected as the *furA*-overexpressing strain was named AG2770FurA.

1.3.4 SDS-PAGE and Western blotting

Filaments of copper-induced exconjugants from 50 ml cultures were collected by centrifugation, washed with 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) and sonicated in an ice-water bath by five 30 s bursts with 30 s cooling intervals. The resulting crude extracts were centrifuged at $12000 \times g$ for 5 min at 4°C to remove cell debris, and the protein concentration was determined using the BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). For each sample, 30 μg of total protein was loaded and separated by SDS-PAGE with a 17% polyacrylamide gel, and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore). Rabbit polyclonal antibodies raised against *Anabaena* sp. FurA recombinant protein were used (Hernández *et al.*, 2002), and the blot was visualized with an Universal Hood Image Analyzer (Bio-Rad).

1.3.5 Measurements of growth and pigments

Growth of wild-type *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and its derivative strain AG2770FurA was measured spectrophotometrically using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian). The optical density of the cell suspensions was recorded at 750 nm every 72 h in triplicate with independent cultures. The specific growth rate and doubling time were calculated as previously described (Stein, 1973). In order to confirm the spectrophotometric readings, the PCV was also determined at certain times during incubation using 5 ml graduated centrifuge tubes of 60 μl capacity. Readings of the PCV were taken after centrifugation for 5 min at $2000 \times g$ using a swing-bucket rotor, and expressed as microliters of fresh cells per milliliter of culture.

Cultures were sampled at exponential and stationary phases of growth for measurement of pigments and total protein. Chl *a* (Nicolaisen *et al.*, 2008), carotenoid (Davies, 1976) and phycobiliprotein (Glazer, 1976) contents were determined according to previously

described methods. Total soluble protein present in cell extracts after sonication was determined using the BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Pigments and protein contents were expressed in micrograms per microliter of PCV.

1.3.6 Microscopy

Bright-field and fluorescence microscopic examinations of *Anabaena* sp. filaments were carried out with a Nikon Eclipse 50i Epi-fluorescence microscope. Micrographs were taken with a Nikon DXM1200F camera coupled to the microscope. The images were processed with Adobe Photoshop version 6.0.

For electron microscopy, filaments were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde prepared in 66 mM phosphate buffer for 1 h at room temperature. After fixation, the samples were washed in phosphate buffer and then fixed again in 2% (w/v) osmium tetroxide for 1 h at room temperature. Dehydration was performed in a series of cold ethanol dilutions allowed to warm to room temperature at the higher concentrations, followed by infiltration with Spurr resin. Sections were cut on a Reichert Om U2 ultramicrotome, collected on nickel grids, stained with uranyl acetate and examined with a TECNAI G200 transmission electron microscope (FEI) operated at 120 V. The images were processed with Adobe Photoshop version 6.0.

1.3.7 Photosynthetic oxygen evolution

Oxygen evolution of exponentially growing cells was measured at 25°C with a Clark-type oxygen electrode model Chlorolab 2 (Hansatech). Cell suspensions ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chl *a*) were illuminated with white light at saturating intensity ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dark respiration was estimated from O₂ uptake by cells incubated in the dark. Total oxygen evolution was calculated as the sum of the apparent oxygen evolution in the light and dark respiration.

1.3.8 Antioxidant enzymes assays

Cyanobacterial cells were grown to late log phase in 50 ml of standard BG-11 medium, collected by centrifugation, and sonicated in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7). Supernatant obtained after centrifugation of the crude extracts was used for enzyme assays. Protein concentration was determined using the BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). CAT activity was determined according to the method of Beers and Sizer (Beers & Sizer, 1952). Dissociation of H₂O₂ was followed spectrophotometrically at 240 nm in a 3 ml reaction mixture containing 20 mM H₂O₂ and crude extract (600 µg ml⁻¹ total proteins) at 25°C. One unit of enzyme was defined as the quantity that catalyzes the decomposition of 1 µmol of H₂O₂ in 1 min. SOD activity was determined according to the method of Winterbourn *et al.* (Winterbourn *et al.*, 1975), based on the ability of SOD to inhibit the photochemical reduction of nitro-blue tetrazolium (NBT) by superoxide in a 3 ml reaction mixture containing 2 µM riboflavin, 50 µM NBT, 0.06 M EDTA, 20 µM sodium cyanide and crude extract (600 µg ml⁻¹ total proteins). One unit of enzyme was defined as the amount causing half maximal inhibition of NBT reduction. Activities of enzymes were expressed as units per milligram of protein.

1.3.9 Tolerance to oxidative stress induced by H₂O₂

Tolerance of *Anabaena* sp. cells to the oxidative stress caused by H₂O₂ exposure was measured according to Shcolnick *et al.* (Shcolnick *et al.*, 2009) with slight modifications. Basically, the strains were grown to late log phase in standard BG-11 medium, washed, and adjusted to an optical density at 750 nm of 1.0 in BG-11 medium. Aliquots of 200 µl of adjusted cultures were put on a microtiter plate and incubated for 48 h in the presence of 0-4 mM H₂O₂ in darkness. The results were documented by photography, and chlorosis

was estimated by reading the absorbance at 620 nm using a Multiskan EX microplate photometer (Thermo Fisher Scientific).

1.3.10 ROS determination

Levels of intracellular ROS in *Anabaena* sp. strains were quantified according to Latifi *et al.* (Latifi *et al.*, 2005) by using the fluorescent probe CM-H₂DCFDA, which detects H₂O₂, hydroxyl radicals and peroxynitrite anions. Cyanobacterial cells were grown to late log phase in 50 ml of standard BG-11 medium, washed twice with 10 mM phosphate buffer and incubated with 25 µM CM-H₂DCFDA (Invitrogen) for 5 min at room temperature in darkness. Fluorescence was measured using an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorometer (Thermo Fisher Scientific), with excitation and emission settings of 488 nm and 530 nm, respectively. Cells of the wild-type strain treated with 1 mM H₂O₂ for 30 min were used as the fluorescent-positive control.

Additionally, the amount of intracellular H₂O₂ was specifically determined by the ferrithiocyanate method (Thurman *et al.*, 1972). Briefly, 95-100 mg of fresh cells were homogenized with 5% trichloroacetic acid (TCA), centrifugated at 12000 × g for 5 min at 4°C, and the supernatant obtained was used for peroxide estimation. Reaction mixtures contained 800 µl of crude extract, 160 µl of 50% TCA, 160 µl of ferrous ammonium sulfate and 80 µl of potassium thiocyanate. The absorbance of the ferrithiocyanate complex was read at 480 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian), and compared with H₂O₂ standard. Peroxide content was expressed as micromoles per milligram of FW. Cells of the wild-type strain treated with 1 mM H₂O₂ for 30 min were used as the control.

1.3.11 Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA (1 µg) was heated at 85°C for 10 min and used as template for the first-strand cDNA synthesis. Residual DNA in RNA preparations was eliminated by digestion with RNase-free DNase I (Roche, Basel, Switzerland). The absence of DNA was checked by PCR. Reverse transcription was carried out using SuperScript retrotranscriptase (Invitrogen) in a 20 µl reaction volume containing 150 ng of random primers (Invitrogen), 1 mM deoxyribonucleotide triphosphate mix (GE Healthcare) and 10 mM DTT. The sequences of the specific primers used for each RT-PCR analysis are given in Table 1.2. The housekeeping gene *rnpB* (Vioque, 1992) was used as an internal control to compensate for variations in the input of RNA amounts and normalize the results. The exponential phase of PCR for each gene was determined by measuring the amount of PCR product at different numbers of cycles. For the final results, 20-23 cycles were used for the analysis at the early exponential phase of PCR in all genes tested. The PCR products were resolved by electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and analyzed using a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

1.3.12 EMSAs

Recombinant *Anabaena* sp. FurA protein was produced in *E. coli* BL21(DE3) using the expression vector pET28a (EMD Biosciences), and purified according to a previously described method (Hernández *et al.*, 2002). The promoter regions of each gene of interest were obtained by PCR using the primers listed in Table 1.2. EMSAs were performed as described previously (Hernández *et al.*, 2006a). Briefly, 100-120 ng of each DNA fragment were mixed with recombinant FurA protein at a concentration of 150, 300, 500 and 700 nM in a 20 µl reaction volume containing 10 mM bis-Tris (pH 7.5), 40 mM KCl, 100 µg ml⁻¹ bovine serum albumin, 1 mM DTT, 100 µM MnCl₂ and 5% (v/v) glycerol. In some

experiments, EDTA was added to a final concentration of 200 μ M. To insure the specificity of EMSA, the promoter region of the *Anabaena* sp. *nifJ* (*alr1911*) gene was included as non-specific competitor DNA in all assays (López-Gomollón *et al.*, 2007a). Binding assay of the promoter region of the gene *furA* was included as the EMSA positive control (Hernández *et al.*, 2004a; Hernández *et al.*, 2006a). Mixtures were incubated at room temperature for 20 min and subsequently separated on a 4% non-denaturing polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine) at 90 V. The gel was stained with SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) and processed with a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

Table 1.2. List of oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
2770FurA_up	CATATGACTGTCTACACAAATACTTCG	Cloning of <i>furA</i> into pAM2770
FurA_dw	GGATCCCTAAAGTGGCATGAGCG	Cloning of <i>furA</i> into pAM2770
rnpB_up	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG	RT-PCR
rnpB_dw	AAAAGAGGAGAGAGTTGGTGG	RT-PCR
FurA_up	CGGGATCCATGACTGTCTACACAAATAC	RT-PCR
FurA-5last_dw	ACGCGTCGACCTAACGTTGGCACTTGGG	RT-PCR
psaA_up	TGGCAGTTGTGACAATTTGG	RT-PCR
psaA_dw	GGGCGAACAATACACCTTTC	RT-PCR
psaB_up	CTTCGGTCACCTGGCAATC	RT-PCR
psaB_dw	GCCAGGGCCAATTGTTAAG	RT-PCR
psaL_up	ATGGCGCAAGCAGTAGACG	RT-PCR
psaL_dw	AGTAAGCGACTACTGCACCACC	RT-PCR
psbA_up	GCTAATTTATGGCATAGATTCGG	RT-PCR
psbA_dw	GAAAGAAATGCAAAGAACGGG	RT-PCR
psbB_up	GTAGTTCTGAATGACCCAGGGC	RT-PCR
psbB_dw	CGGCGTGACCAAAGGTAAAC	RT-PCR

Table 1.2. List of oligonucleotides used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5 to 3')	Purpose
psbZ_up	TTATGAAGCGCTATTGGTCACG	RT-PCR
psbZ_dw	ACCCCGTTTTAGTGCTGATTC	RT-PCR
sodA_up	CTCTGTGGCAACGGTTTATTG	RT-PCR
sodA_dw	CTTTGCCGTGAAGCTTGG	RT-PCR
sodB_up	CCACTACCCTACGACTTTAATGC	RT-PCR
sodB_dw	AAGCTGGGCGAGCATTTTC	RT-PCR
GCT1_up	ATGCCAGTTAAAGTTGG	RT-PCR
GCT1_dw	CTATTTACTCGCCAACTG	RT-PCR
GCT3_up	ATGCCTCTAGCGTTTGGTAC	RT-PCR
GCT3_dw	TTACAGTCCCAAAGCCGC	RT-PCR
gor_up	GGCTGCTTCTAAACGAGCTGC	RT-PCR
gor_dw	GGAGGGATGAATGCCAACG	RT-PCR
mreB_up	GTGGGGCTTTTTAGGAACTTTC	RT-PCR
mreB_dw	CTACATATTTTCGAGATCGTCCG	RT-PCR
mreC_up	ATGGTTACTGTACGTCGTTGGTG	RT-PCR
mreC_dw	CTAGTTGGACTTTTGTGCTGTG	RT-PCR
alr0397_up	CATTAATCAGCCATCCTGGC	RT-PCR
alr0397_dw	GTTTCGCGGAGATAAAAATGC	RT-PCR
FurB_up	ATGAGAGCCATACGCAC	RT-PCR
FurB_dw	CTAAATTTCACTCGCGTG	RT-PCR
FurC_up	ATGCAGCAACAGGCAATATC	RT-PCR
FurC_dw	GAGGATGCCGATATCCATAG	RT-PCR
IsiA_up	CTGCTCTGACAACCCTCTGG	RT-PCR
IsiA_dw	CAGCTAACTTGACTGTATCGGC	RT-PCR
PnifJ_up	GCCTACTCTGCGAGTTCTCCG	EMSA
PnifJ_dw	GGCCTGTGAGAGTTGCTGCAC	EMSA
PfurA_up	CTCGCCTAGCAATTTAACAAC	EMSA
PfurA_dw	GCCTTGAGCGAAGTATTTGTC	EMSA
PpsaAB_up	GCAAACCTCAGCAAATTTGTCTG	EMSA
PpsaAB_dw	GAGGACTAATTGTCATTCGACC	EMSA
All0107-1	GCAGCTACTATCTGGCTGAC	EMSA
All0107-2	GATGCGTCTACTGCTTGCG	EMSA
Alr3742-1	CAGCATTGGCAACGGCTCC	EMSA
Alr3742-2	CATACATTCGATTTTCCGTAAGT	EMSA
Ppsb_up	GTAACGGCGATCTGTGGGAAG	EMSA
Ppsb_dw	CATCGACTACGCTCCTCCTCG	EMSA

Table 1.2. List of oligonucleotides used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5 to 3')	Purpose
All1258-1	GCACATAAGCAGACTACACAAG	EMSA
All1258-2	GACAAGGGCAAGCAGACGTG	EMSA
PsodA_up	GATAGAATCAATGACTGCTC	EMSA
PsodA_dw	GTGTGCTGCCTCTTATTTG	EMSA
PsodB_up	GCTTAGTAGTCCCTTTGC	EMSA
PsodB_dw	CATTTTGTGAAGTCCTCTC	EMSA
GCT1-Prom_up	GGTTTGGCTGTAATTTATCG	EMSA
GCT1-Prom_dw	CAGAGTCTCCAACCTTAACTG	EMSA
GCT3-Prom_up	GATCGCACCTACGGAAACG	EMSA
GCT3-Prom_dw	GGCATAATGAACCTTTCCTG	EMSA
PGor-1	CTCTCTGGACATCGCTTAGT	EMSA
PGor-2	CCAGAACCAGCACCAATTAC	EMSA
PmreBC_up	GCCTTATCCTTTAGTAC	EMSA
PmreBC_dw	GAAAGTTCCTAAAAAGC	EMSA
Palr0397_up	CATCCTACATGAAGATTAATG	EMSA
Palr0397_dw	CGCCTATTATTATTGACTTG	EMSA

1.4 RESULTS

1.4.1 FurA overexpression from the copper-inducible *petE* promoter

A derivative strain of *Anabaena* sp. PCC 7120 showing a high level of expression of FurA was generated using the shuttle vector pAM2770 (Lee *et al.*, 2003); it contained an extra copy of the wild-type *furA* gene located downstream of the copper inducible *petE* promoter (Buikema & Haselkorn, 2001). The strain obtained, named AG2770FurA, showed increased levels of the FurA protein both in standard BG-11 medium and in BG-11 supplemented with copper to 0.4 μ M, according to Western blot analysis (Fig. 1.1). However, there was no appreciable increase in the amount of FurA after supplementation of BG11 with additional copper, suggesting a high induction of the *petE* promoter with the concentration of copper normally present in this medium.

Consequently, standard BG-11 was used in further analyses. As previously found in cyanobacterial FurA (Pellicer *et al.*, 2010), as well as in other Fur family proteins (Lee & Helmann, 2006b; Ortiz de Orué Lucana & Schrempf, 2000), additional minor bands of FurA with different gel mobility appear as a result of oxidation of cysteines in the air and intrafragment disulfide bond formation.

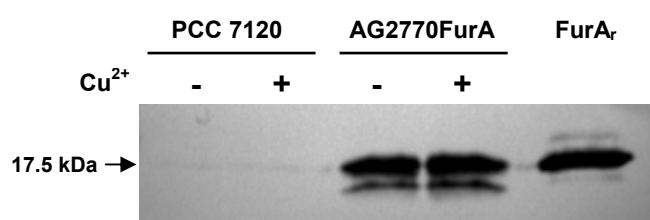


Figure 1.1. Levels of FurA protein in wild-type *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and *furA*-overexpressing strain AG2770FurA revealed by Western blotting. Total cell extracts from filaments grown in BG-11 medium with (+) and without (-) additional supplementation with copper were separated by SDS-PAGE, electrotransferred, and challenged with anti-FurA antiserum. Recombinant FurA overexpressed and purified from *E. coli* was included as control. Molecular weight is indicated.

1.4.2 Overexpression of FurA alters cyanobacterial morphology

Photoautotrophic growth of wild-type and *furA*-overexpressing strains in BG-11 medium was compared by following the cell yields during 24 d in terms of optical density at 750 nm (Fig. 1.2). The strain AG2770FurA showed a slower growth, with a doubling time of 4.07 d and a specific growth rate of 0.17 d⁻¹ (in contrast to 3.15 d and 0.22 d⁻¹ for the wild type), which determined minor cell yields in all growth phases. Values of packed cell volume (PCV) were in accordance with spectrophotometrical readings, showing a linear relationship. For this reason, the PCV was used as the parameter for cell mass in further determinations.

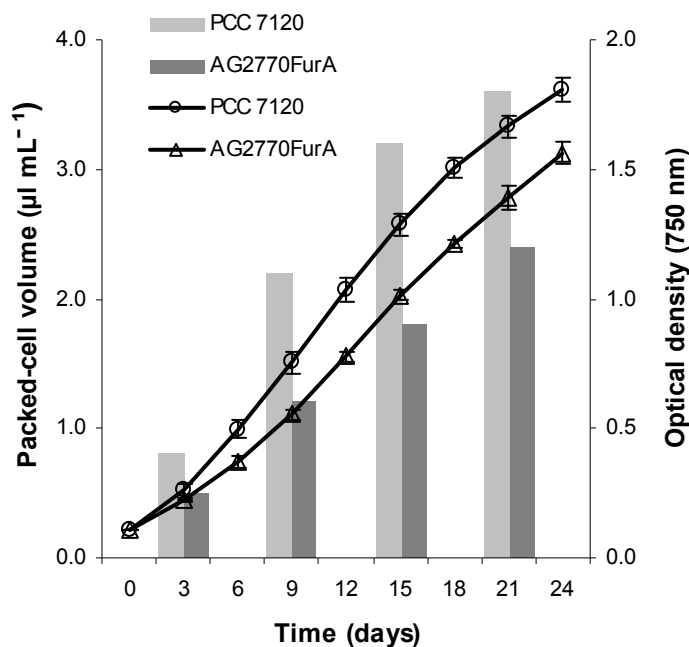


Figure 1.2. Growth of *furA*-overexpressing strain AG2770FurA in comparison to the wild-type strain PCC 7120, expressed as both packed-cell volume (columns) and optical density (lines). Values are the averages of three independent experiments; standard deviations are represented by vertical bars. Please note that in some instances the error is smaller than the symbols used.

Microscopic examination of cultures in the exponential phase of growth revealed appreciable morphological changes in the strain AG2770FurA compared with its parental strain PCC 7120. Unlike the wild type, whose filaments formed large chains of elliptically shaped cells and highly uniform size (Fig. 1.3A), the *furA*-overexpressing strain showed an abundance of short filaments and even single cells, with rounded shape and loss of the characteristic uniformity in cell size, resulting in cells with both increased and diminished sizes compared with the wild type (Fig. 1.3B). In addition, the intrinsic fluorescence of cells appeared partially affected, since changes in the intensity of fluorescence of individual cells were observed along a single filament (Fig. 1.3C, D).

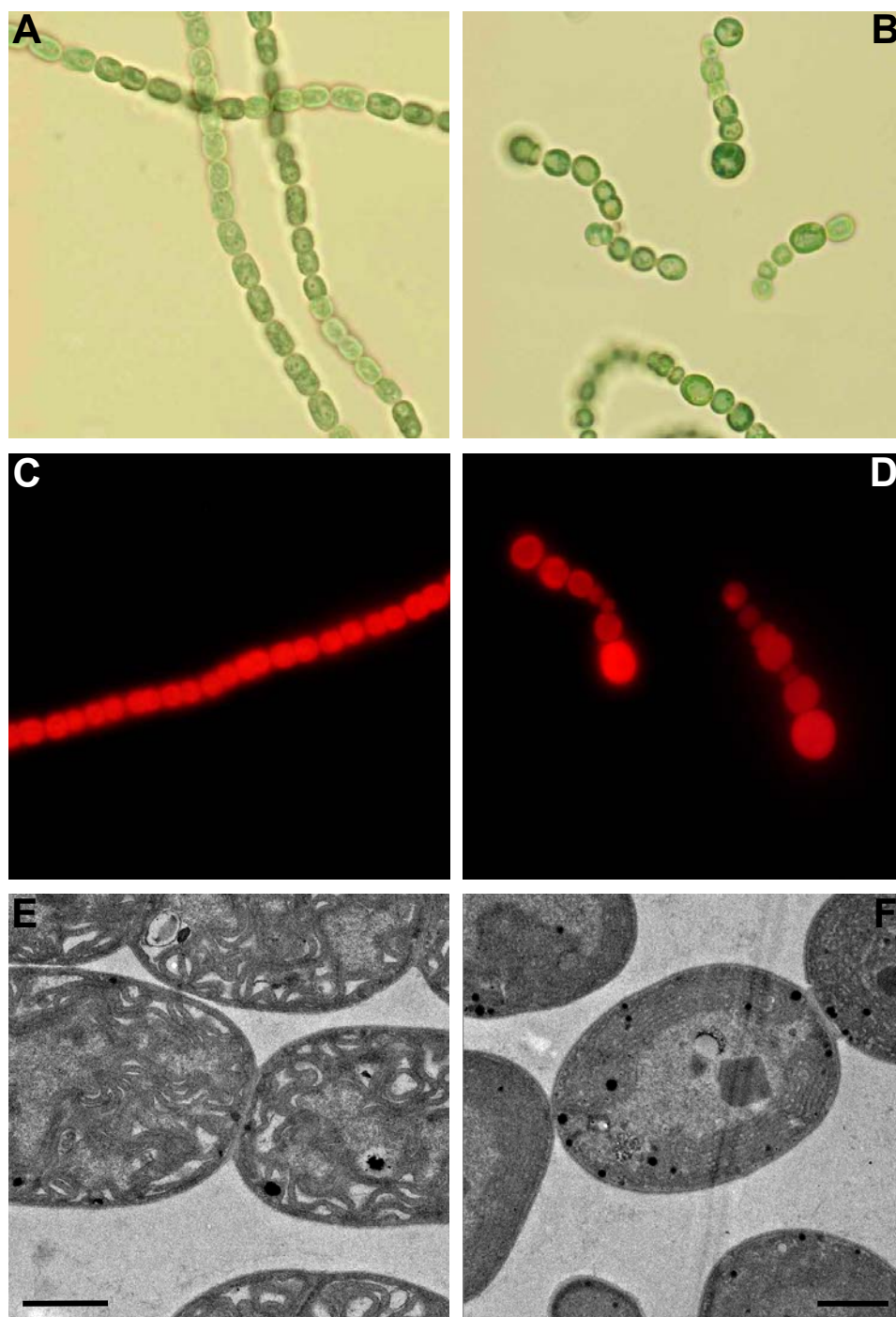


Figure 1.3. Overexpression of FurA induced morphological and ultrastructural changes in *Anabaena* sp., as shown in photomicrographs of wild-type strain PCC 7120 (A, C, E) and *furA*-overexpressing strain AG2770FurA (B, D, F) taken at the exponential phase of growth. Bright-field (A, B) and fluorescence (C, D) microscopic examinations revealed alterations in filament length, cell shape/size and intrinsic fluorescence. Transmission electron microscope analysis (E, F) showed differences in thylakoids arrangement. Photomicrograph of each strain is representative of at least 10 different images. Bars, 1 μ m.

Transmission electron microscopy analysis revealed differences in the ultrastructure, especially in the thylakoid arrangement. Whereas in the wild-type strain the thylakoids appeared in contorted arrays homogeneously distributed in the cytoplasm (Fig. 1.3E), in the *furA*-overexpressing strain the thylakoid membranes appeared evenly spaced and closely appressed to the periphery of cells (Fig. 1.3F).

1.4.3 Overexpression of FurA decreases photosynthetic activity

To determine whether overexpression of FurA affected the photosynthetic activity of *Anabaena* sp., we compared the oxygen evolution of wild-type and *furA*-overexpressing strains using a Clark-type oxygen electrode. Exponentially growing *Anabaena* cells overexpressing FurA evolved oxygen at about 50% of the rate of the wild type (Table 1.3), while dark respiration did not show significant variation between the strains.

Table 1.3. Photosynthetic oxygen evolution and dark respiration of exponentially growing cells of *Anabaena* sp. strains PCC 7120 and AG2770FurA

Parameter	<i>Anabaena</i> sp. strain ^a	
	PCC 7120	AG2770FurA
Apparent O ₂ evolution	45.6 ± 2.1 ^b	19.2 ± 1.2 ^b
	115.6 ± 5.3 ^c	46.5 ± 2.8 ^c
O ₂ consumption	5.7 ± 2.2 ^b	7.7 ± 3.5 ^b
	14.6 ± 5.6 ^c	18.7 ± 8.6 ^c
Total O ₂ evolution	51.4 ± 4.3 ^b	26.9 ± 4.7 ^b
	130.3 ± 11.0 ^c	65.4 ± 11.4 ^c

^a*Anabaena* sp. strains were grown photoautotrophically in BG-11 medium to mid-log phase, filaments were washed twice and resuspended to 10 µg ml⁻¹ Chlorophyll *a*.

^bValues are means of two independent determinations ± SD, expressed as µmol O₂ mg Chlorophyll *a*⁻¹ h⁻¹.

^cValues are means of two independent determinations ± SD, expressed as µmol O₂ ml PCV⁻¹ h⁻¹.

Hence, the photoautotrophic growth data and measurements of oxygen evolution demonstrated that the *furA*-overexpressing strain was markedly compromised in photosynthetic function, but this decline could not be accounted for merely on the basis of differences in pigment contents. In fact, the strain AG2770FurA showed slightly higher amounts of Chl *a*, carotenoids and phycobiliproteins compared with the wild type (Table 1.4). Thus, the decrease in photosynthetic performance in a FurA overexpression background could be a consequence of changes in the expression pattern of photosynthesis genes, or could be a result of pleiotropic effects such as oxidative stress.

Table 1.4. Pigments and protein contents of *Anabaena* sp. strains PCC 7120 and AG2770FurA at different stages of growth

Pigment/proteins ^a	Exponential phase		Stationary phase	
	PCC 7120	AG2770FurA	PCC 7120	AG2770FurA
Chlorophyll <i>a</i>	1.42 ± 0.25	2.46 ± 0.15	3.31 ± 0.42	3.74 ± 0.23
Carotenoids	0.19 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.58 ± 0.06	0.61 ± 0.01
Phycobiliproteins	6.15 ± 0.46	7.75 ± 0.35	22.5 ± 0.8	21.5 ± 0.6
Total soluble proteins	59.5 ± 3.2	65 ± 2.5	120 ± 6.8	125 ± 5.1

^aValues are means of two independent determinations ± SD, expressed as µg µl⁻¹ PCV.

1.4.4 Overexpression of FurA decreases catalase and superoxide dismutase activities

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities of cell-free extracts of wild-type and *furA*-overexpressing strains were measured to determine whether the enhanced expression of FurA affected the antioxidant defenses of *Anabaena* sp. Both enzymatic

activities appeared clearly decreased in strain AG2770FurA compared with the wild type (Fig. 1.4), although CAT activity was particularly affected, displaying a > 4-fold decrease. As expected, this appreciable reduction in the ability of cells to remove hydrogen peroxide (H_2O_2) led to a considerable decrease in the tolerance of the *furA*-overexpressing strain to oxidative stress resulting from exposure to exogenous H_2O_2 (Fig. 1.5). However, the AG2770FurA strain was still capable of effectively tolerating up to 300 μM of exogenous H_2O_2 .

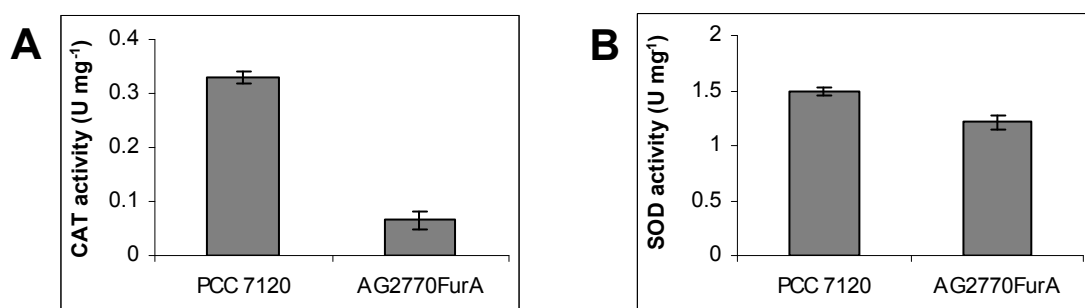


Figure 1.4. Catalase (A) and superoxide dismutase (B) activities in wild-type *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and *furA*-overexpressing strain AG2770FurA. Values are the averages of two independent experiments; standard deviations are represented by vertical bars.

Levels of intracellular ROS in wild-type and *furA*-overexpressing strains were determined using two different methods. Fluorometric measurement of the oxidized form of the cell permeant probe chloromethyl- 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM- H_2DCFDA) permits H_2O_2 , hydroxyl radicals and peroxynitrite anions within the cell to be detected nonspecifically (Latifi *et al.*, 2005). However, since CAT activity was particularly affected in the AG2770FurA strain, the intracellular peroxide content was also specifically estimated by the ferrithiocyanate method (Thurman *et al.*, 1972).

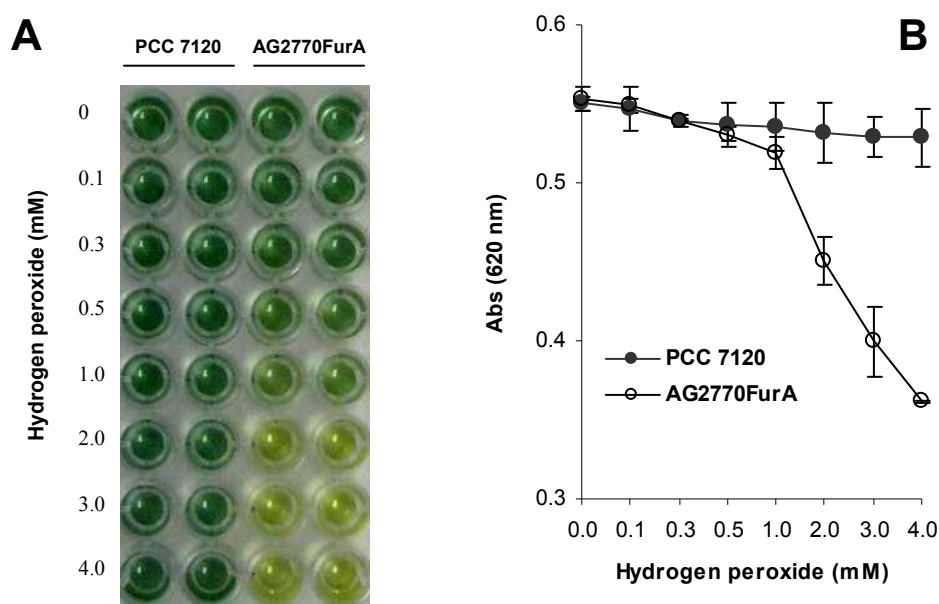


Figure 1.5. Tolerance to oxidative stress induced by exogenous hydrogen peroxide exposure. (A) *Anabaena* sp. strains were grown in BG-11 medium to late log phase, washed and adjusted to the same cellular density. Cell suspensions were exposed in duplicate to increasing concentrations of H_2O_2 up to 4 mM for 48 h in dark, and results were documented by photography. (B) Estimation of chlorosis by reading the microtiter plate absorbance at 620 nm. Experiment was done twice with similar results.

Surprisingly, the reduction in the antioxidant capabilities observed in the *furA*-overexpressing strain did not lead to an increase in the levels of ROS accumulated by cells during the exponential phase of photoautotrophic growth. ROS production was similar and even slightly lower in the strain AG2770FurA compared with the wild type, perhaps as a result of a lower photosynthetic activity (Table 1.5). Similar results were observed when endogenously generated H_2O_2 was specifically measured by the ferrithiocyanate method. Taken together, these results suggested that FurA overexpression decreased oxidative stress defenses, but did not lead to induced oxidative stress in *Anabaena* sp.

Table 1.5. Intracellular ROS levels of late-log growing cells of *Anabaena* sp. strains PCC 7120 and AG2770FurA

Strain	ROS level	
	CM-H ₂ DCFDA fluorescence ^a	Ferrithiocyanate ^b
PCC 7120	20.2 ± 0.4	0.073 ± 0.008
AG2770FurA	15.1 ± 0.1	0.055 ± 0.004
Control ^c	98.6 ± 0.6	0.322 ± 0.053

^aValues are means of two independent determinations ± SD, presented in arbitrary units.

^bValues are means of two independent determinations ± SD, expressed as μmol H₂O₂ mg FW⁻¹.

^cWild-type PCC 7120 strain treated with 1 mM H₂O₂ during 30 min.

1.4.5 Overexpression of FurA induces changes in the transcriptional pattern of a variety of genes

On the basis of the phenotypic changes observed in the AG2770FurA strain, we investigated the impact of FurA overexpression on the transcription of a variety of genes involved in several physiological processes such as photosynthesis, oxidative stress defense and control of cellular morphology. Semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to compare the levels of transcripts of selected genes in wild-type and *furA*-overexpressing strains (Fig. 1.6). In order to obtain accurate determinations, each measure was performed at the early exponential phase of the PCR of each gene. The *rnpB* housekeeping gene was included in all RT-PCR analyses to ensure that equivalent amounts of total RNA were being used in all reactions. The relative induction ratio observed for each analyzed gene is presented in Table 1.S1.

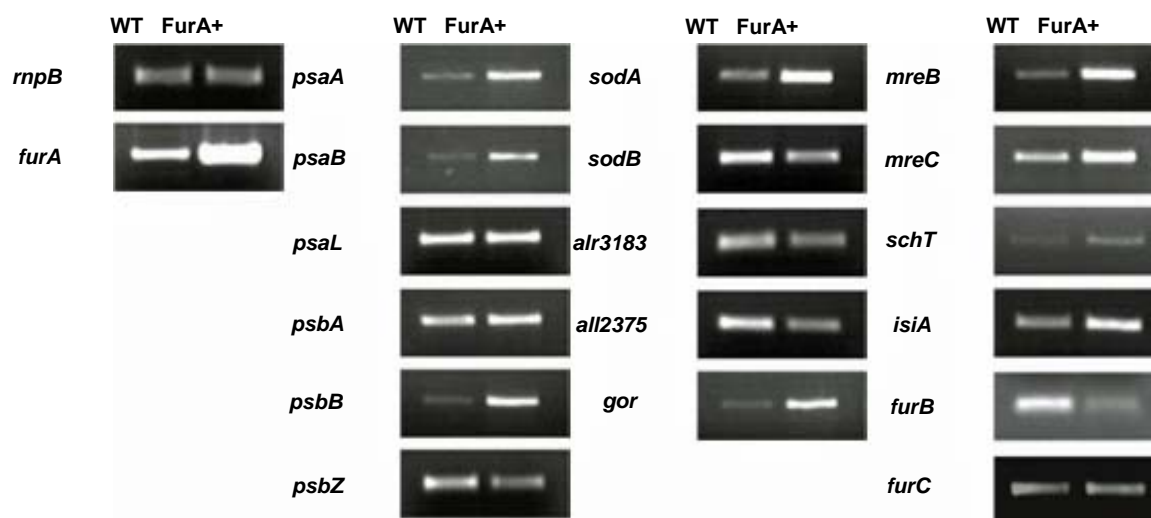


Figure 1.6. Semiquantitative RT-PCR analysis of the expression of several genes involved in a variety of physiological processes like photosynthesis, oxidative stress defence, cellular morphology and iron stress response in wild-type strain PCC 7120 (WT) and *furA* overexpressing strain AG2770FurA (FurA+). Total RNA was isolated from cells grown in standard BG-11 medium during the exponential phase of growth. Housekeeping gene *rnpB* was used as control. Determinations for each gene were performed in the exponential phase of PCR. Experiments were repeated at least twice with independent RNA extractions, and the relevant portions of a representative gel are shown.

The analysis of the expression of some genes encoding subunits of PSI and PSII showed different effects of a FurA overexpression background on transcription of photosynthesis genes. Transcripts of the PSI genes *psaA* and *psaB*, encoding the reaction center proteins PsaA and PsaB, respectively, as well as those of the PSII gene *psbB* coding for the core antenna CP47 protein was clearly increased in the *furA*-overexpressing strain compared with the wild type, while transcripts of *psbA* encoding the PSII reaction center protein D1 were only slightly increased. However, at least one gene, *psbZ*, coding for an 11 kDa PSII protein, showed a reduced amount of transcripts. Thus, despite the increased pigment and phycobiliprotein contents found in the *furA*-overexpressing strain, the direct or indirect effect of FurA overexpression in down-regulation of other non-essential but important

regulatory proteins, such as PsbZ (Bishop *et al.*, 2007), could produce an imbalance among components of the photosystems in AG2770FurA cells.

Table 1.S1. Relative induction ratio of selected genes in strain AG2770FurA in relation to wild-type PCC 7120 strain, as result of semiquantitative RT-PCR analysis^a

Gene	Signal _{AG2770FurA} / Signal _{wild-type}
<i>furA</i> (<i>all1691</i>)	3.23 ± 0.02
<i>psaA</i> (<i>alr5154</i>)	3.86 ± 0.68
<i>psaB</i> (<i>alr5155</i>)	4.34 ± 0.38
<i>psaL</i> (<i>all0107</i>)	1.07 ± 0.05
<i>psbA</i> (<i>alr3742</i>)	1.23 ± 0.06
<i>psbB</i> (<i>all0138</i>)	4.58 ± 0.36
<i>psbZ</i> (<i>all1258</i>)	0.56 ± 0.04
<i>sodA</i> (<i>all0070</i>)	2.82 ± 0.23
<i>sodB</i> (<i>alr2938</i>)	0.63 ± 0.02
<i>alr3183</i>	0.55 ± 0.01
<i>all2375</i>	0.50 ± 0.01
<i>gor</i> (<i>all4968</i>)	5.81 ± 1.23
<i>mreB</i> (<i>all0087</i>)	3.18 ± 0.42
<i>mreC</i> (<i>all0086</i>)	1.59 ± 0.05
<i>schT</i> (<i>alr0397</i>)	2.73 ± 0.14
<i>isiA</i> (<i>all4001</i>)	1.64 ± 0.03
<i>furB</i> (<i>all2473</i>)	0.38 ± 0.04
<i>furC</i> (<i>alr0957</i>)	0.88 ± 0.03

^aSignal assigned to each gene corresponded to the intensity of DNA band in the agarose gel stained with ethidium bromide, normalized to the signal observed for housekeeping gene *rnpB* in each strain. Values are means of two independent determination ± SD.

The expression of several antioxidant enzymes described in *Anabaena* sp. PCC 7120 was also analyzed. Transcripts of the most abundant thiol peroxidases, namely GCT1 (*alr3183*) and GCT3 (*all2375*) (Cha *et al.*, 2007), were reduced in the *furA*-overexpressing strain, while transcripts of glutathione reductase were increased. Interestingly, the transcriptional patterns of SODs observed in the *furA*-overexpressing strain resembled those previously described in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Hassett *et al.*, 1996) and *E. coli*

(Dubrac & Touati, 2000) after iron deprivation. While transcripts of manganese-containing SOD (*sodA*) appeared increased, the amounts of the iron-containing SOD (*sodB*) were reduced. Additionally, some of the iron-responsive genes described in *Anabaena* sp. seemed to be up-regulated in the *furA*-overexpressing strain AG2770FurA, such as those encoding the siderophore outer membrane transporter SchT (Nicolaisen *et al.*, 2008) and the IsiA protein.

The overexpression of FurA also led to an increase in the transcription of some genes involved in control of cellular morphology, such as those for the bacterial actins MreB and MreC (Hu *et al.*, 2007). Conversely, a second ferric uptake regulator described in *Anabaena*, FurB, with a possible role in oxidative stress protection (López-Gomollón *et al.*, 2009), seemed to be down-regulated, while transcript levels of FurC decreased only slightly in the AG2770FurA strain.

1.4.6 Identification of novel FurA direct target genes

To determine whether the expression of genes previously analyzed by RT-PCR was directly regulated by FurA, we investigated the ability of FurA to bind *in vitro* the promoter regions of such genes by using EMSAs. To confirm the specificity of bindings, all assays included the promoter region of *nifJ* as non-specific competitor DNA, while binding of FurA to the promoter region of its own gene was used as a positive control. All gene promoters used in the analyses consisted of a 300-400 bp DNA fragment upstream of ATG. We assumed that genes giving a positive result in both RT-PCR analyses and EMSAs were direct targets of FurA.

Despite the high variation in transcript levels of photosynthesis genes under a FurA overexpression background, the EMSAs showed only a clear binding of FurA to the promoter region of *psbA*, a PSII gene coding for the reaction center protein D1 (Fig.

1.7B). Interestingly, *psbA* has been previously shown to respond to iron deprivation by increasing its transcriptional level (Singh & Sherman, 2000), but this is the first evidence, to the best of our knowledge, of a direct regulation by a Fur. None of the other analyzed components of both photosystems showed specific binding to FurA according to EMSA (data not shown).

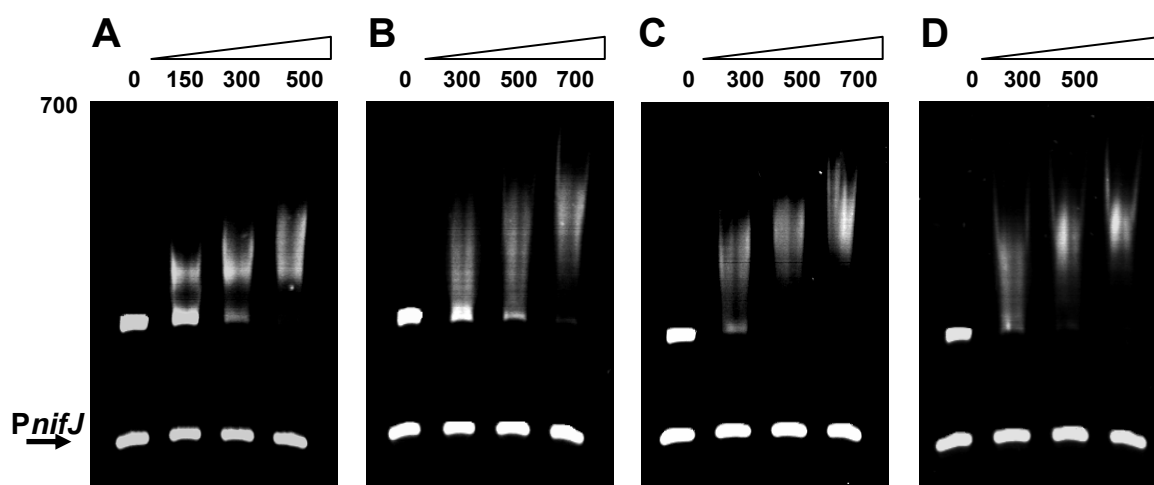


Figure 1.7. Electrophoretic mobility shift assays showing the ability of FurA to bind in vitro the promoter regions of target genes *psbA* (B), *schT* (C), and *mreBCD* (D). Binding of FurA to its own promoter (A) was included as positive control. DNA fragments free or mixed with increasing concentrations of recombinant FurA protein were separated on a 4% PAGE. In gels, protein concentration (indicated in nM) increases from left to right. The promoter region of *nifJ* gene was used as non-specific competitor DNA in all assays.

Similarly, no apparent direct regulation by FurA of antioxidant enzyme expression was seen according to binding assays. Neither promoters of both SODs nor those of GCT1 and GCT3 thiol-peroxidases showed specific affinity of FurA. A similar result was also observed with the glutathione reductase promoter (data not shown).

It has been previously shown that the binding affinity of FurA for its target promoters is greatly affected by the redox status of the protein and the presence of divalent metal ions (Hernández *et al.*, 2006a). Thus, the optimal binding conditions have been observed in the

presence of both dithiothreitol (DTT) and Mn^{2+} , which are routinely used in the FurA EMSA experiments. Taking into account the tight connection between iron homeostasis and oxidative stress defenses, as well as previous reports of Fur direct regulation of SOD gene transcription in other bacteria (Ernst *et al.*, 2005), we further characterized the effect of divalent metal ion and redox conditions on the DNA-binding of FurA to SOD promoters, in order to determine whether pre-established binding conditions affected the affinity of FurA for these putative targets. Neither the absence of Mn^{2+} (+EDTA) nor non-reducing conditions improved the affinity of FurA for SOD promoters (data not shown). As expected, the EMSA analysis showed that FurA bound with high affinity to the promoter region of *schT* (Fig. 1.7C), a gene encoding a membrane transporter of the siderophore schizokinen (Nicolaisen *et al.*, 2008). Likewise, the *mreBCD* operon, encoding the bacterial actins MreB, MreC and MreD (Hu *et al.*, 2007), seemed also to be directly regulated by FurA according to the binding assays (Fig. 1.7D). In agreement with the EMSA results, computational analysis of the promoter regions of those targets allowed the identification of potential AT-rich iron boxes (Fig. 1.S1).

```

PpsbA1 -----CTTGACAACCTATATTATTATAAAAGTTATATATGATTGTAAGAC-----
PschT1 -----GTTATTAATGATAATGTCAGCAAGAATAATTCCTAACAGTAAATAGACA
PschT2 -----ATATTTTAATAAAAATCAAAAACATTGCTAATGCAAGTCAATAATAA-----
PmreB1 -----GTATTTCTGCATATTTTTTACTGTAAATTTATTGCTA-----
PmreB2 -----GTCACAATTAGTTATGATTAAAGTCAAAATTAATAAGTA-----
PfurA(site II)-----TTAATAAATATTCTCAATAAGCAATGTTTGTGCAAA-----
PfurA(site I) -TCCAAATATTTTGTATATTCTCAATTAACAAGCTTT-----
PisiB(site II)-----TTTAATAATTTTAAATGCAAAATAGTCTAATAAATCTGATACTATA---
PisiB(site I) -----CAAAGCTTATTGAAATAAATATTCAATCCGTTAAC-----

Consensus E.coli ---GATAATGATAATCATTATCGATAATGATAATCATTATC-----

```

Figure 1.S1. Alignment of *psbA*, *schT* and *mreB* promoter regions with FurA-binding sites experimentally determined in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2006a) and the Fur consensus in *E. coli* (Escolar *et al.*, 1999).

Overall, the combination of RT-PCR analyses and EMSAs led us to identify three novel FurA direct targets: the photosynthesis gene *psbA*, the iron metabolism gene *schT* and the morphology-related operon *mreBCD*.

1.4.7 Metal co-repressor and reducing conditions are critical for the affinity of FurA for direct target genes

The overexpression of FurA showed two different effects on the transcriptional pattern of direct target genes. While most of those targets seemed to be up-regulated, at least one of them, *furB*, decreased its transcript level. In order to determine whether these different effects were a consequence of differences in the mechanism of regulation, we further analyzed the impact of several binding conditions (by removing Mn^{2+} and/or DTT) on the affinity of FurA for the promoters of targets that had shown different transcriptional response in RT-PCR analyses. Notably, the affinity of FurA for all the target promoters analyzed was markedly affected in the absence of Mn^{2+} (and addition of EDTA) and/or DTT (Fig. 1.8). The results demonstrated that the presence of a metal co-repressor and reducing conditions are critical in the function of FurA, confirming previously obtained evidences (Hernández *et al.*, 2006a). Thus, differences in the transcriptional patterns of target genes in a FurA overexpression background might reflect a coordinated action of more than one transcriptional regulator, rather than differences in the mechanism of regulation of FurA on its direct target genes.

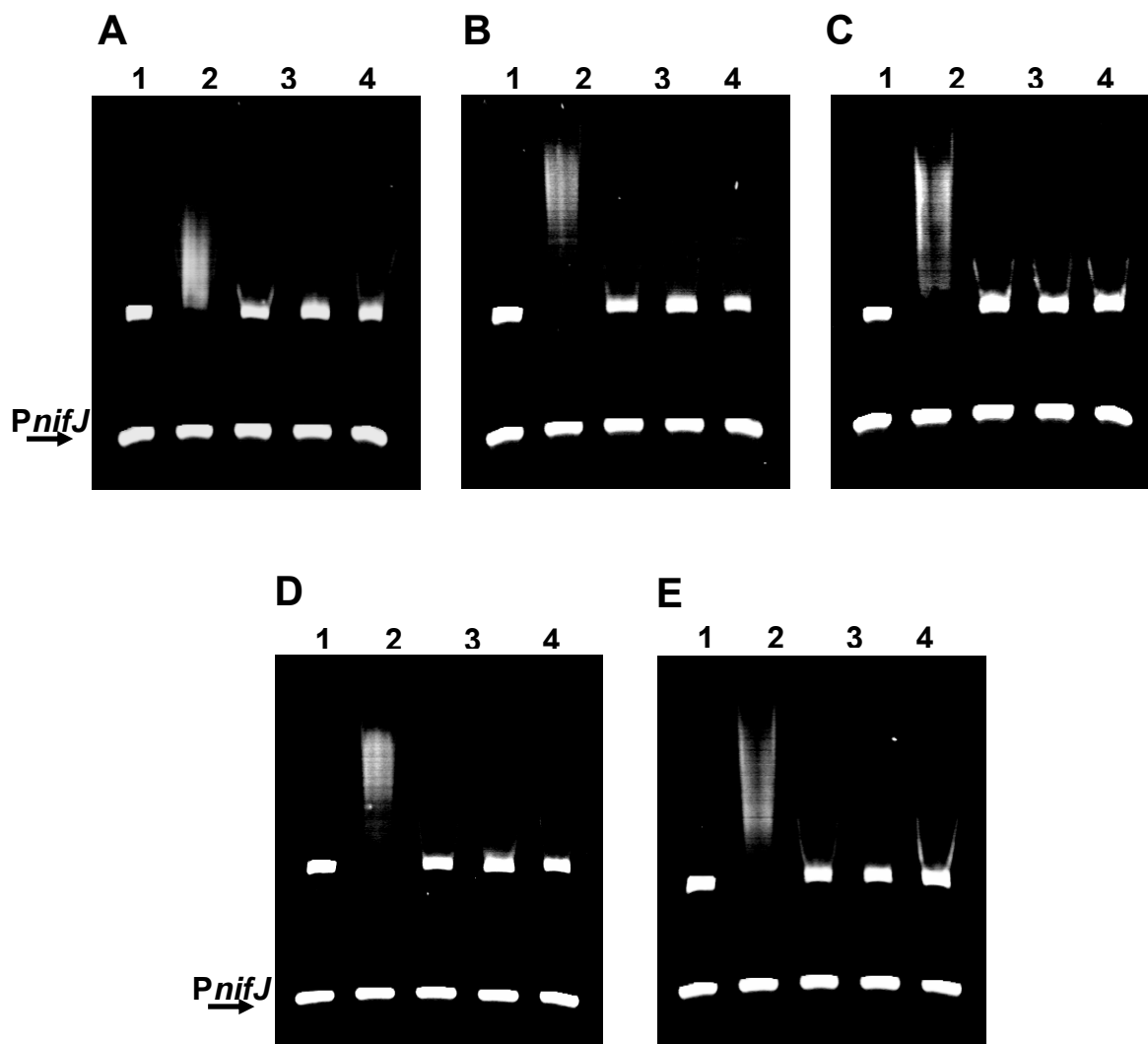


Figure 1.8. Impact of metal corepressor and reducing conditions on the in vitro affinity of FurA to target genes *psbA* (A), *schT* (B), *mreBCD* (C), *furB* (D) and *isiA* (E). DNA fragments free (line 1) or mixed with recombinant FurA protein at concentration of 500 nM (lines 2 to 5) in presence of Mn^{2+} and DTT (2), EDTA and DTT (3), Mn^{2+} without DTT (4), and EDTA without DTT (5) were separated on a 4% PAGE. The promoter region of *nifJ* gene was used as non-specific competitor DNA in all assays.

1.5 DISCUSSION

Although numerous studies have revealed insights into the structure, mechanism of action and functions of Fur proteins in heterotrophic bacteria (Escolar *et al.*, 1999; Hantke, 2001; Baichoo *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2003; McHugh *et al.*, 2003; Danielli *et al.*, 2006; Lee

& Helmann, 2007; Gao *et al.*, 2008), comparatively little is known about the role of this family of proteins in cyanobacteria. In the present study, we have constructed a strain of *Anabaena* sp. that overexpresses active FurA by using a shuttle plasmid with the copper-responsive *petE* promoter fused to a *furA* gene copy. Overexpression of FurA induced changes in the transcriptional pattern of a variety of genes, leading to alterations in photoautotrophic growth, filament integrity, cell morphology, ultrastructure, photosynthetic function and defense against oxidative stress. Although some of the effects observed in the FurA overexpression phenotype could result from an aberrant response unrelated to the normal function of the protein, the overexpression approach led us to identify novel direct targets of this apparently essential transcriptional regulator by combining the analysis of the phenotypic changes with both transcriptional profile variations and FurA-DNA interactions.

Perhaps the most evident effects of the overexpression of FurA on the *Anabaena* phenotype were the slowing down of photoautotrophic growth and the altered morphology of cells. These effects appeared to be directly associated with the overexpression of the regulator, since the wild-type *Anabaena* sp. PCC 7120 and the *Anabaena* sp. strain harboring the empty vector pAM2770 showed identical phenotypes (data not shown).

Measurement of oxygen evolution of the strain AG2770FurA indicated a strong effect on the photosynthetic activity, while RT-PCR analyses revealed different effects of FurA overexpression on the transcriptional pattern of several genes involved in photosynthesis. At least one of those genes, *psbA*, encoding the PSII reaction center protein D1, was directly regulated by FurA according to EMSA. Although only a few genes were analyzed, at least one (*psbZ*) seemed to be down-regulated with the overexpression of FurA. The PsbZ subunit of PSII has been described in *Synechocystis* sp. as a modulator of the electron flow through the photosynthetic electron transfer chain (Bishop *et al.*, 2007). Deletion

mutants of the *pbsZ* gene showed a retarded photoautotrophic growth compared with the wild type. Since expression of photosynthesis genes is influenced by multiple factors and modulated by several transcriptional regulators (Fujimori *et al.*, 2005; Li & Sherman, 2000; Seino *et al.*, 2009), our results could suggest not only a direct influence of FurA on photosynthesis regulation, but also an indirect effect, perhaps as a result of a coordinated action of different regulators, as observed with FurA and NtcA in nitrogen metabolism (López-Gomollón *et al.*, 2007a). The depletion in photosynthetic function undoubtedly had additional consequences on cellular physiology; many of these effects could be pleiotropic effects of FurA overexpression. The slightly increased amount of photosynthetic pigments and/or the rearrangement of thylakoid membranes could be adaptive responses of the microorganism in an attempt to improve the photosynthesis performance.

Our experiments led us to identify another direct target of FurA, the operon *mreBCD*. In particular, the bacterial actin MreB has been shown to play a critical role in determination of cell shape of *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hu *et al.*, 2007). Either *mreB* deletion or *mreBCD* -inducible overexpression caused drastic morphological changes in *Anabaena* cells. The increased level of *mreB/mreC* transcripts observed in a FurA overexpression background could explain the morphological alterations seen in the strain AG2770FurA. Likewise, although the increased fragility of filaments in the *furA*-overexpressing strain could be a result of different factors, the overexpression of FurA could directly or indirectly affect the expression of genes associated with filament integrity (Bauer *et al.*, 1995; Nayar *et al.*, 2007).

The intimate relationship between iron metabolism and oxidative stress has been extensively recognized in bacteria (Zheng *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003; Latifi *et al.*, 2005). In *E. coli*, the expression of Fur is modulated by oxidative stress response regulators, and Fur directly or indirectly regulates the expression of antioxidant enzymes.

Anabaena sp. PCC 7120 has a quorum of oxidative stress defenses, including Mn- and Fe-containing SODs (Li *et al.*, 2002), peroxidases (Cha *et al.*, 2007), glutathione reductase (Jiang *et al.*, 1995) and several non-characterized CATs. In our experiments, the overexpression of FurA decreased both CAT and SOD activities, and had different effects of the transcriptional pattern of SODs, thiol-peroxidases and glutathione reductase. However, the results suggest that FurA does not directly regulate the expression of these antioxidant enzymes according to EMSA analyses. This fact could reflect a possible regulatory cascade or an indirect pathway of regulation of antioxidant enzyme gene expression by FurA, as previously described in other bacteria (Masse & Gottesman, 2002). Likewise, the existence of two additional Fur homologs in *Anabaena* sp. (Hernández *et al.*, 2004a) makes it possible that there are other Fur-mediated regulation pathways, as described in microorganisms with more than one Fur protein (Horsburgh *et al.*, 2001).

In cyanobacteria, siderophore-mediated iron uptake is thought to be a contributing factor in their ability to dominate eukaryotic algae. *Anabaena* sp. PCC 7120 synthesizes schizokinen as its major siderophore, although it also shows iron uptake from aerobactin and ferrioxamine B (Goldman *et al.*, 1983). Recently, Nicolaisen and co-workers described an outer membrane transporter for schizokinen in *Anabaena*, named SchT, whose expression is induced under iron-limited conditions (Nicolaisen *et al.*, 2008). Our results indicate that *schT* is a direct target of FurA.

Unexpectedly, most of the novel and previously described FurA direct targets seemed to be up-regulated rather than down-regulated in a transcriptional repressor overexpression background, including those recognized as iron-responsive genes. Additionally, the transcriptional patterns observed in SOD genes resembles those described in wild-type strains of *P. aeruginosa* (Hassett *et al.*, 1996) and *E. coli* (Dubrac & Touati, 2000) after iron deprivation. It has been previously hypothesized that Fur proteins might act as ferrous

ion “buffers” in the cell, and consequently have a dual action during redox stress, regulating the iron uptake and iron storage systems, but also themselves increasing the Fe²⁺-binding capacity of the cytosol (Andrews *et al.*, 2003). Since metal co-repressors seem to be essential for FurA DNA binding, we speculate that the high level of FurA overexpression achieved by the strain AG2770FurA using the *PpetE*-pAM2770 system strongly reduces the free iron pool in the cytosol and leads to the release of the co-repressor from some FurA-Fe²⁺ complexes, allowing the transcription of target genes. A similar phenomenon has been observed in *Saccharomyces cerevisiae* when ferritins were overexpressed under iron-replete conditions (Kim *et al.*, 2007).

Our data provide evidence that in *Anabaena* sp. PCC 7120, FurA acts directly or indirectly on the expression of genes involved in a variety of physiological processes, including iron metabolism, cellular morphology, photosynthesis and defense against oxidative stress. Taken together, the results strongly support the hypothesis that, as other Fur homologs described in heterotrophic bacteria, FurA is a global transcriptional regulator in cyanobacteria.

CAPÍTULO 2

Análisis proteómico comparativo de la estirpe de sobreexpresión *Anabaena* sp. AG2770FurA

González A, Bes T, Peleato ML, Fillat MF.
Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through
2-D DIGE proteomic analysis.
Journal of Proteomics 2011; 74 (5): 660-671.

2.1 ABSTRACT

The *Anabaena* sp. PCC 7120 ferric uptake regulator FurA controls iron homeostasis and appears implicated in a broad regulatory network, whereas failures to eliminate wild-type copies of *furA* gene from the polyploid genome suggest essential functions. In the present study, we comparatively analyzed the proteomes of a *furA*-overexpressing strain and its parental wild-type in conjunction with subsequent semi-quantitative RT-PCR and electrophoretic mobility shift assays, in order to identify direct transcriptional targets and unravel new biological roles of FurA. The results of such approach drove us to find 10 novel direct targets belonging to different functional categories including photosynthesis, energy metabolism, oxidative stress defences, redox regulation, signal transduction mechanisms, DNA replication, thiamine biosynthesis and heterocyst differentiation. Two peroxiredoxins and the thioredoxin reductase exhibited the most significant changes in both mRNA level and protein abundance under a FurA overexpression background, indicating a connection between iron metabolism, redox signalling and oxidative stress defences. A FurA box consensus sequence was ill-defined. The results suggest that particular DNA structures rather than a defined sequence govern FurA regulation of its target genes. Overall, the results provide new insights into the FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120.

2.2 INTRODUCTION

Iron is crucial for many major cellular processes, but also potentially toxic due to its tendency to catalyse free radical generation. Bacteria tightly regulate their iron metabolism in response to iron availability by a predominant regulatory system orchestrated by members of a family of proteins known as ferric uptake regulator (Fur). The classical model describes Fur as a dual function protein that senses intracellular free iron level and,

under iron-rich conditions, binds to Fe^{2+} and acts as a transcriptional repressor by binding to “iron boxes” located in the promoter regions of iron-responsive genes. Under iron-restricted conditions, the complex Fur- Fe^{2+} is dissociated and the repressor becomes inactive, leading to transcription of target genes (Andrews *et al.*, 2003)

Several studies have shown that Fur works as a global regulator that control not only the expression of iron acquisition and storage systems, but also a large number of genes and operons involved in different cellular processes (Escolar *et al.*, 1999; McHugh *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). In some microorganisms Fur has been also described acting as a positive regulator in controlling gene expression (Masse & Gottesman, 2002; Delany *et al.*, 2004), while cross-talk with other transcriptional regulators (López-Gomollón *et al.*, 2007a), as well as iron-independent mechanisms of transcriptional repression (Ernst *et al.*, 2005) have been documented.

In the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 (also known as *Nostoc* sp. PCC 7120), the ferric uptake regulator FurA modulates the expression of iron uptake proteins like SchT, a siderophore outer membrane transporter, but have been also implicated in the regulation of genes involved in photosynthesis, cellular morphology, oxidative stress defences and differentiation of heterocysts (Hernández *et al.*, 2007; López-Gomollón *et al.*, 2007a; González *et al.*, 2010). Previous analyses have shown that FurA is a constitutive protein, whose expression is slightly increased under iron deprivation (Hernández *et al.*, 2002). The *in vitro* affinity of FurA for its target genes is strongly affected by the absence of divalent metal ions or thiol-reducing agents, suggesting the importance of metal co-repressor and the redox status of cysteines for the interaction with DNA *in vivo* (Hernández *et al.*, 2006a; González *et al.*, 2010).

As previously observed with other cyanobacterial Fur homologues (Ghassemian & Straus, 1996), attempts to inactivate the gene *furA* from the polyploid genome of *Anabaena* sp.

have resulted only in a partial segregation of the mutated chromosomes, which could indicate an essential role of this protein under standard culture conditions (Hernández *et al.*, 2006b). Recently we have obtained a strain of *Anabaena* sp. that exhibited a high level of expression of active FurA by using a shuttle vector with the copper-responsive *petE* promoter fused to a *furA* gene copy (González *et al.*, 2010). The overexpression of the regulator induced changes in the transcription pattern of a variety of genes leading to alterations in photoautotrophic growth, filament integrity, cell morphology, ultrastructure, photosynthetic function and defence against oxidative stress, supporting the role of FurA as a global transcriptional regulator.

In the present study we have analyzed the effect of FurA overexpression on the proteome profile of *Anabaena* sp. using the 2-D DIGE approach. This comparative proteomic analysis led us to identify 10 novel FurA direct targets involved in different cellular processes. The existence of functional FurA box sequences within the target promoters is also discussed.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Bacterial strains and culture conditions

The *furA*-overexpressing strain *Anabaena* sp. AG2770FurA (González *et al.*, 2010) and wild-type *Anabaena* sp. PCC 7120 harbouring empty pAM2770 shuttle vector were grown photoautotrophically in triplicate cultures at 30°C in BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979) supplemented with neomycin 50 µg ml⁻¹, using 250 ml Erlenmeyer flasks containing 60 ml culture medium.

Cyanobacterial cells were cultured using an incubator shaker at 120 rpm under continuous illumination with white light (20 µE m⁻² s⁻¹) to mid-log phase, harvested by centrifugation

at $8000 \times g$ for 10 min at 4°C , and washed twice with ice-cold PBS (pH 7.4). Cell pellets were collected for immediate protein extraction.

2.3.2 Protein extraction

Protein extraction was carried out according to previously described method (Barrios-Llerena *et al.*, 2007). Briefly, cell pellets from triplicate cultures of each strain were individually suspended in a multidetergent lysis/extraction buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 2% ASB-14, 1% DM, 20% glycerol, 200 mM potassium chloride, 1 mM PMSF and 100 mM dibasic sodium phosphate (pH 7.6), followed by grinding three times under liquid nitrogen. After centrifugation at $27000 \times g$ for 30 min at 4°C , the insoluble debris were discarded and soluble fractions were precipitated using the 2-D-Clean Up Kit (GE Healthcare). Cold acetone washings were repeated until the resulting supernatants were clear. Then, the pellets were resuspended in 30 mM Tris-HCl, 8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (pH 8.5). Protein concentration of each sample was determined by using the Bradford assay (Bio-Rad).

2.3.3 2-D DIGE

The proteome samples were labelled for DIGE analysis using N-hydroxysuccinamide esters of cyanine fluorescent dyes from GE Healthcare, according to the manufacturer recommendations. Proteome samples (50 μg) were labelled with 400 pmol of dye at 4°C in the dark for 30 min. The labelling reaction was stopped by addition of 1 μl of 10 mM lysine and incubation was continued on ice in the dark for 15 min.

Three 2-DE gels were performed. Each contained a pair of Cy3- and Cy5-labelled samples (50 μg of protein of each sample), corresponding to the wild-type and *furA*-overexpressing strains (dye-swaps were performed), and a 50 μg aliquot of a Cy2-labelled pooled standard

made by mixing equal amounts of the two proteomes compared. The mixtures (150 µg) were diluted 1:1 with the loading buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 2% DTT and 4% Pharmalytes, pH 3-11).

First dimension IEF separation of the 2-DE was performed with 24 cm Immobiline IPG-strips (GE Healthcare) providing a non-linear pH 3-11 gradient. They were passively rehydrated with 450 µl of rehydration buffer (7M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 100 mM DeStreak and 2% Pharmalytes, pH 3-11) during 12 h. The mixtures samples were then applied by cup loading. The IEF was performed at 20°C using the following sequential steps: 120 V for 1 h; 500 V for 2 h; 500-2000 V gradient for 2 h; 1000-5000 V gradient for 6 h; 5000 V for 12 h. After the IEF, strips were equilibrated for 12 min in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 2% DTT, followed by a second equilibration with 2.5% iodoacetamide in the same buffer. The strip was applied on top of a 22×26 cm homogeneous polyacrylamide 12% T, 2.6% C gel (National Diagnostic) casted in low fluorescent glass plate Ettan DALT six system (GE Healthcare). Electrophoresis was performed at 2 W/gel for 17 h at 20°C.

2.3.4 Image acquisition and DIGE data analysis

After electrophoresis, CyDye-labelled gels were scanned directly between the glass plates, using a Typhoon 9400 (GE Healthcare). For the Cy3, Cy5 and Cy2 image acquisition, the 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm and 488 nm/520 nm excitation/emission wavelengths were used respectively, adjusting the pixel size resolution to 100 µm. The gel images obtained were cropped in the ImageQuant v5.1 software (GE Healthcare) and analyzed using DeCyder v6.5 software (GE Healthcare). The differential in-gel analysis module was used to assign spot boundaries and to calculate the normalized spot volumes. Inter-gel variability was corrected by matching and normalization with the internal standard spot

maps in biological variation analysis module. The internal standard image gel with the greatest number of spots was used as a master gel. Average ratio and unpaired Student's t-test were calculated between groups, applying the False Discovery Rate (Bland & Altman, 1995) to reduce false positives. Protein spots with an average ratio $\geq \pm 1.5$ and a $p < 0.05$ were considered as differentially expressed with statistical significance between the groups compared.

2.3.5 MALDI-TOF MS analysis and protein identification

After the fluorescence scanning, the 2-DE gels were stained following the colloidal Coomassie blue protocol (Neuhoff *et al.*, 1988). Protein identification was done at the Proteomic Facility from Universidad Complutense de Madrid-Parque Científico de Madrid, Spain (UCM-PCM), a member of ProteoRed Network. Spots of interest were manually excised from micro preparative gels using biopsy punches. Proteins selected for analysis were in-gel reduced, alkylated and digested with trypsin according to Shevchenko (Shevchenko & Shevchenko, 2001). Briefly, spots were washed twice with water, shrunk 15 min with 100% acetonitrile and dried in a Savant SpeedVac (Thermo Electron) for 30 min. Then, the samples were reduced with 10 mM dithioerythritol in 25 mM ammonium bicarbonate for 30 min at 56°C and subsequently alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 15 min in the dark. Finally, samples were digested with 12.5 ng μl^{-1} sequencing grade trypsin (Roche) in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) overnight at 37°C. After digestion, the supernatant was collected and 1 μl was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 μl of a 3 mg ml^{-1} of α -cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acid matrix (Sigma) in 50% acetonitrile were added to the dried peptide digest spots and allowed again to air-dry at room temperature.

MS analyses were performed in a MALDI-TOF/TOF spectrometer 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). The instrument was operated in reflector positive ion mode, with an accelerating voltage of 20000 V. All mass spectra were internally calibrated using auto-digested trypsin peptides. MALDI-TOF spectra with a S/N > 20 were collated and represented as a list of monoisotopic molecular weights. Proteins for which peptide mass fingerprints provided an ambiguous identification were subjected to MS/MS sequencing analyses. MALDI TOF/TOF fragmentation spectra with a signal-to-noise > 10 were collected by selecting the suitable precursor ions of each MALDI-TOF peptide mass map. Fragmentation was carried out using the acquisition method 1 kV ion reflector mode CID on and precursor mass window ± 10 Da.

For protein identification, the non-redundant NCBI database was searched using MASCOT 2.1 (www.matrixscience.com) through the Global Protein Server v3.6 from Applied Biosystems. The MASCOT search parameters were: (i) species: all; (ii) allowed number of missed cleavages: 1; (iii) fixed modification: carbamidomethyl cysteine; (iv) variable modification: oxidized methionine; (v) peptide tolerance: ± 50 -80 ppm; (vi) MS/MS fragment tolerance: ± 0.3 Da; and (vii) peptide charge: +1. Identifications were accepted as positive when at least 4 matching peptides and at least 10% peptide coverage of theoretical sequences matched, setting the probability score at $p < 0.05$. The CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) nomenclature was followed for gene identity assignment.

2.3.6 Reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA from exponentially growing *Anabaena* sp. strains was isolated as described previously (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Samples of 1 μ g RNA were heated at 85°C for 10 min and used as template for the first strand cDNA synthesis. Residual DNA in RNA preparations was eliminated by digestion with RNase-free DNase I (Roche). The absence

of DNA was checked by PCR. Reverse transcription was carried out using SuperScript retrotranscriptase (Invitrogen) in a 20 μ l reaction volume containing 150 ng of random primers (Invitrogen), 1 mM dNTP mix (GE Healthcare) and 10 mM DTT. The sequences of the specific primers used for RT-PCR reactions are defined in Table 2.S1. Housekeeping gene *rnpB* (Vioque, 1992) was used as a control to compensate for variations in the input of RNA amounts and normalize the results. Exponential phase of RT-PCR for each gene was determined by measuring the amount of PCR product at different time intervals. For the final results, 20-23 cycles at the early exponential phase were used in all genes analyzed. The PCR products were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and analyzed using a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

Relative induction ratio for each gene was calculated as the ratio between signals observed in AG2770FurA and wild-type strains in at least two independent determinations. Signal assigned to each gene was corresponded to the intensity of DNA band in the agarose gel stained with ethidium bromide normalized to the signal observed for housekeeping gene *rnpB* in each strain (González *et al.*, 2010).

2.3.7 Electrophoretic mobility shift assays

The promoter regions of each gene of interest were obtained by PCR using the primers described in Table 2.S1. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as described previously (Hernández *et al.*, 2006a). Briefly, 120-140 ng of each DNA fragment were mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300, 500 and 700 nM in a 20 μ l reaction volume containing 10 mM bis-Tris (pH 7.5), 40 mM potassium chloride, 100 μ g ml⁻¹ bovine serum albumin, 1 mM DTT, 100 μ M manganese chloride, and 5% glycerol. In some experiments, EDTA was added to a final concentration of 200 μ M. To

insure the specificity of EMSA, the promoter region of *Anabaena* sp. *nifJ* (*alr1911*) gene (López-Gomollón *et al.*, 2007a) was included as nonspecific competitor DNA in all assays. In addition, the promoter region of *furA* was included as positive control, (Hernández *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006a), while promoters from *Anabaena* sp. *sodA* and *sodB* genes were used as negative controls (González *et al.*, 2010). Mixtures were incubated at room temperature for 20 min, and subsequently separate on 4% non-denaturing polyacrylamide gels in running buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine) at 90 V. Gels were stained with SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) and processed with a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

Table 2.S1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
RT-PCR	
rnpB_up	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG
rnpB_dw	AAAAGAGGAGAGAGTTGGTGG
alr4641_RT-up	GCCTCCGCGTTGGTCAAC
alr4641_RT-dw	CGGGAGTCATGGTCTTTTCCC
all1541_RT-up	CGAGAAGGTCAAAGAGTTCCTC
all1541_RT-dw	GGCTTCTGAGCCACCAATTAATAC
all0737_RT-up	CTGGTGCAACTGCCAAGC
all0737_RT-dw	GCGCTACTGGCTGAGTTTCTAAC
all5219_RT-up	GCCCCGTGATATTCGCTTAAC
all5219_RT-dw	GCACCAACTACCGCCAC
all5218_RT-up	CCGGCTATCAAAGGTGTACC
all5218_RT-dw	CACACCAGCGTGCAGAGC
all0865_RT-up	GGGACTTCAATTAGAGCCGATG
all0865_RT-dw	CGCACATACTCGCCACTATGG
all0982_RT-up	GGGGAAGAATGATTATCCCAG
all0982_RT-dw	CCCTTCTACCATCACCTGTACATC
alr3768_RT-up	GATCATGACCTAACCCAGAATGG

Table 2.S1. Primers used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')
alr3768_RT-dw	CCGCTTGGGTACGGTCATC
all3556_RT-up	GCGATCGCAAGCTCTGCAAG
all3556_RT-dw	CGCGGCAATACAAGATTGTCC
all1940_RT-up	GGTGGGGATGGACACCAG
all1940_RT-dw	CCGGTCGTCTGTAAGGATG
<i>EMSA</i>	
PfurA_up	CTCGCCTAGCAATTTAACAAC
PfurA_dw	GCCTTGAGCGAAGTATTTGTC
PnifJ_up	GCCTACTCTGCGAGTTCTCCG
PnifJ_dw	GGCCTGTGAGAGTTGCTGCAC
PsodA_up	GATAGAATCAATGACTGCTC
PsodA_dw	GTTGTTGCCTCTTATTTG
PsodB_up	GCTTAGTAGTCCCTTTGC
PsodB_dw	CATTTTGTGAAGTCCTCTC
Pall0865_up	CGAGGTAGCCGCAGATAATAG
Pall0865_dw	GCTGCGGACTGCCATTG
Pall3556_up	CGATAATGGGATTGGCATGAG
Pall3556_dw	GCGATCGCCATTGCCTAAC
Pall1541_up	CCACCAAGCAGCTTTGAC
Pall1541_dw	GGTGACTTGAGGAACTCTTTGAC
Palr4641_up	CATCCATTTGCTACTCAAAATCG
Palr4641_dw	CCTGATCAACTACAGCTGTTGC
Pall0737_up	CCTATCCACTGCGGCGG
Pall0737_dw	CTACTAGCTTGAGCCACTTCAAG
Pall5219_up	CCTCCACAATTACAGAAAGATTC
Pall5219_dw	GGGTA CTTGTAAGCATGAATAGC
Pall5218_up	GGGTTGTGAATAAGCAGGAG
Pall5218_dw	GGGCATAAGTAGCGATTTTC
Palr3768_up	CCTTACTTTTCATAAAGTTGAC
Palr3768_dw	CACTCATCGTTACACTCACTC
Pall0982_up	GGCTGCTGATGTCACTATCC
Pall0982_dw	CCGCATATGAAATTCCCTC
Pall1940_up	CTTCGGCTACACCTGCG

Table 2.S1. Primers used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')
Pall1940_dw	CGCGATATTGAACGACTAAG
Ironboxfrag1-5_up	CCTTGTGATTGGAGTTTATAC
Ironboxfrag1_dw	CTTTAATCAAGATTAGTGAAAATC
Ironboxfrag2_dw	GCTTATTGAGAATATTTATTAAAC
Ironboxfrag3_dw	GATTTGCAACAAACATTG
Ironboxfrag4_dw	GAATATAACAAATATTTGGAGTG
Ironboxfrag5_dw	CTCAACAAAGCTTGTTAATTG
Ironboxfrag6_up	GCAATGTTTGTGCAAATCAC
Ironboxfrag7_up	TCCAAATATTTGTTATATTC
Ironboxfrag8_up	CTCAATTAACAAGCTTTGTTGAG
Ironboxfrag9_up	GTTGAGAAAAATTAGTATGACTG
Ironboxfrag6-9_dw	GCTTGTGTCCTTCGCCTAATTC

2.4 RESULTS

2.4.1 Proteomic profiles of *Anabaena* wild-type and *furA*-overexpressing strains

In order to analyse the effect of FurA overexpression on the *Anabaena* proteome, we cultured wild-type *Anabaena* sp. PCC7120 and its derivative *furA*-overexpressing strain AG2770FurA in standard BG-11 medium to mid-log phase in triplicate experiments. The set of six samples was treated with a multidetergent buffer in order to maximize protein extraction, and whole-cell cleared lysates were subjected to 2-D DIGE analysis.

Using a pH gradient of 3-11, a total of 1326 different protein spots could be observed in each gel image. After gel-to-gel matching, PMF analysis was performed on the spots for which abundance was considered as significantly different ($\geq \pm 1.5$ -fold) between the wild-type and *furA*-overexpressing strains. Based on these criteria, a total of 23 spots showed significant different expression (Fig. 2.1). Globally, more proteins showed underexpression (n=15) than overexpression (n=8) in the AG2770FurA strain in relation to the wild-type.

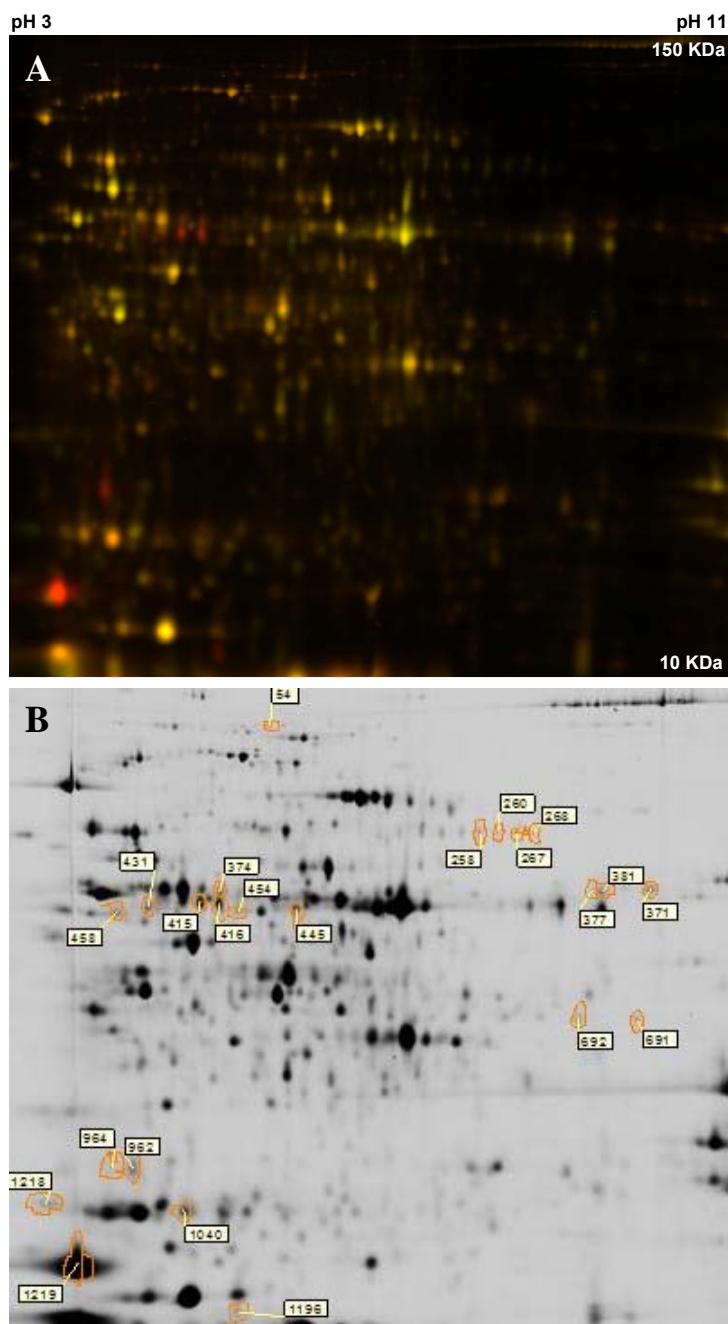


Figure 2.1. 2-DE profile of the compared proteomes of *Anabaena* sp. strains PCC 7120 (wild-type) and AG2770FurA (*furA*-overexpressing strain, derivative from PCC 7120). One of the three gels obtained is shown. (A) Spots identified by fluorescence; protein extracts from AG2770FurA and wild-type strains were respectively labelled with Cy3 and Cy5 fluorescent dyes, while a pooled internal standard was labelled with Cy2. Red spots corresponded to proteins that are more abundant in the wild-type, green spots to proteins that are more abundant in the *furA*-overexpressing strain, and yellow spots to proteins that are equally abundant in both strains. (B) Spots visualized by staining with Coomassie blue; numbered spots corresponded to those that vary in intensity ≥ 1.5 -fold ($p < 0.05$) between both strains.

These spots were excised from gel and subject to PMF analysis in order to identify their putative genes and to deduce their putative functions. Of these spots, 18 could reliably be analyzed by MS, yielding a total of 10 different identified proteins (Table 2.1), which were classified according to their putative biological functions.

Thus, proteins differentially expressed by *Anabaena* strain AG2770FurA appeared involved in a variety of cellular processes including photosynthesis, energy metabolism, oxidative stress defences, redox regulation, DNA replication, signal transduction mechanisms, thiamine biosynthesis and heterocyst differentiation. Notably, proteins involved in oxidative stress defences and redox regulation, like the peroxiredoxins Alr4641 and All1541, and the thioredoxin reductase TrxB (*all0737*) displayed the most striking changes in protein levels (Table 2.2).

Three of the 10 identified proteins displayed more than one spot on the 2-D DIGE gels. Thus, the CO₂ concentrating mechanism protein CcmM (*all0865*) was found in six spots with different pI but grouped, as expected (Long *et al.*, 2010), in two molecular sizes, all of them showing similar average volume ratios. Likewise, the heterocyst differentiation protease Abp1 (*all1940*) and the thioredoxin reductase TrxB (*all0737*) appeared in three and two spots at different pI values, respectively (Fig. 2.1B), maybe as a result of post-translational modifications.

Table 2.1. List of proteins differentially expressed by the *furA*-overexpressing strain AG2770FurA, identified by mass spectrometry

Spot	Gene ID ^a	Protein description ^a	Functional category ^b	NCBI access no. ^c	Mr ^d	pI ^d	Score ^d	Sequence coverage ^d	Peptides matched ^d
258	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	113	15	6
260	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	139	21	8
267	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	245	10	4
268	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	223	10	4
691	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	55	TGSWTSCQPIEAR (55) ^e	
692	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	FS	NP_484908	59827	6.77	163	12	5
431	<i>all3556</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	EM	NP_487596	49018	5.13	92	YYAENAADFLADVS-VK (61) ^e TDASHSFVR (32) ^e	
962	<i>all1541</i>	Peroxiredoxin 2 family protein/glutaredoxin	OD	NP_485581	27692	5.02	89	33	9
1219	<i>alr4641</i>	Peroxiredoxin	OD	NP_488681	22731	4.87	268	43	5
415	<i>all0737</i>	Thioredoxin reductase, TrxB	RR	NP_484780	53356	5.53	312	19	6
416	<i>all0737</i>	Thioredoxin reductase, TrxB	RR	NP_484780	53356	5.53	298	19	6
374	<i>all5219</i>	Putative modulator of DNA gyrase, TldD	DR	NP_489259	53665	5.48	183	19	6
458	<i>all5218</i>	Putative modulator of DNA gyrase, PmbA	DR	NP_489258	48300	5.07	127	15	5
1040	<i>alr3768</i>	Two-component response regulator, OrrA	ST	NP_487808	26219	5.33	153	30	5
445	<i>all0982</i>	Thiamine biosynthesis protein, ThiC	TB	NP_485025	51180	5.62	329	14	5

Table 2.1. List of proteins differentially expressed by the *furA*-overexpressing strain AG2770FurA, identified by mass spectrometry (Cont.)

Spot	Gene ID ^a	Protein description ^a	Functional category ^b	NCBI access no. ^c	Mr ^d	pI ^d	Score ^d	Sequence coverage ^d	Peptides matched ^d
371	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	HD	NP_485980	59570	8.77	276	21	9
377	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	HD	NP_485980	59570	8.77	151	VPTSIQPYLDR (33) ^e IGTENYQAEKPLLER (35) ^e QLDDIVAVTPADIQR (83) ^e	15
381	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	HD	NP_485980	59570	8.77	98	28	15

^aGene identification and protein description according to the cyanobacteria genome database CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>).

^bFunctional categories: FS, photosynthesis; EM, energy metabolism; OD, oxidative stress defences; RR, redox regulation; DR, DNA replication; ST, signal transduction mechanisms; TB, thiamine biosynthesis; HD, heterocyst differentiation.

^cAccession number from the NCBI Protein resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

^dTheoretical Mr and pI (calculated from the amino acid sequence of the translated gene), score, sequence coverage and number of peptides matches as per Mascot Search results.

^eAmino acid sequence identified by MS/MS; the ion score is indicated in parentheses.

Table 2.2. Proteins with significant changes in abundance between *Anabaena* sp. *furA*-overexpressing strain AG2770FurA and its parental wild-type strain PCC 7120

Spot	Gene ID ^a	Protein description ^a	Av. ratio ^b	<i>p</i> -value ^b
1. Photosynthesis				
258	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	1.57	2.4E-02
260	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	1.90	3.7E-02
267	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	1.82	3.8E-02
268	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	1.65	4.1E-02
691	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	2.09	4.6E-03
692	<i>all0865</i>	CO ₂ concentrating mechanism protein, CcmM	1.72	7.4E-03
2. Energy metabolism				
431	<i>all3556</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	-1.57	3.7E-02
3. Oxidative stress defences				
962	<i>all1541</i>	Peroxiredoxin 2 family protein/glutaredoxin	-6.60	3.7E-03
1219	<i>alr4641</i>	Peroxiredoxin	-7.22	7.4E-03
4. Redox regulation				
415	<i>all0737</i>	Thioredoxin reductase, TrxB	-5.06	1.5E-02
416	<i>all0737</i>	Thioredoxin reductase, TrxB	-4.22	7.4E-03
5. DNA replication				
374	<i>all5219</i>	Putative modulator of DNA gyrase, TldD	-2.29	7.4E-03
458	<i>all5218</i>	Putative modulator of DNA gyrase, PmbA	-1.88	3.7E-03
6. Signal transduction mechanisms				
1040	<i>alr3768</i>	Two-component response regulator, OrrA	-1.75	3.8E-02
7. Thiamine biosynthesis				
445	<i>all0982</i>	Thiamine biosynthesis protein, ThiC	1.72	4.6E-02
8. Heterocyst differentiation				
371	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	-1.55	4.5E-02
377	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	-1.52	1.6E-02
381	<i>all1940</i>	Protease, Abp1	-1.53	3.7E-02

^aGene identification and protein description according to the cyanobacteria genome database CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>).

^bAverage volume ratio of the spot (AG2770FurA versus wild-type strain) and *p*-value, quantified by the DeCyder v6.5 biological variation analysis module.

2.4.2 Transcriptional analysis of differentially expressed genes

To investigate whether the alterations in protein expression observed in the AG2770FurA strain occurred at the transcriptional level, semi-quantitative RT-PCR analyses were carried out for all differentially expressed genes. In order to obtain accurate determinations, each measure was performed at the early exponential phase of PCR. The housekeeping gene *rnpB* was included in all RT-PCR analyses to ensure that equivalent amounts of total RNA were being used in all reactions.

Despite inherent differences in sensibility and variability between both techniques, the changes in protein abundance observed with 2D-DIGE were highly consistent with changes in mRNA levels obtained by sqRT-PCR for all genes analysed (Fig. 2.2), underlining the importance of transcriptional regulation in the protein expression patterns of these genes.

2.4.3 Identification of FurA direct targets

To determine whether transcription of these 10 differentially expressed genes could be directly modulated by FurA, we investigated the ability of this transcriptional regulator to bind *in vitro* the promoter region of each corresponding gene by using EMSA. To confirm the specificity of bindings, all assays included the promoter region of *nifJ* as non-specific competitor DNA. The specific binding of FurA to the promoter region of its own gene was used as positive control, while promoters from *Anabaena* sp. superoxide dismutases genes *sodA* and *sodB* were included as negative controls. All gene promoters used in the analyses consisted of 300- to 400-bp DNA fragment upstream ATG. Different binding conditions were analyzed for all genes, since the routinely addition of Mn^{2+} and DTT to the complete removing of each of these additives to the reaction buffer.























Gene	WT	FurA ⁺⁺	mRNA relative induction ratio	Protein fold change
<i>rnpB</i>			0.98 ± 0.03	n.d.
<i>alr4641</i>			0.16 ± 0.02	-7.22
<i>all1541</i>			0.23 ± 0.01	-6.60
<i>all0737</i>			0.27 ± 0.02	-5.06
<i>all5219</i>			0.53 ± 0.04	-2.29
<i>all5218</i>			0.62 ± 0.01	-1.88
<i>alr3768</i>			0.65 ± 0.01	-1.75
<i>all3556</i>			0.71 ± 0.05	-1.57
<i>all1940</i>			0.73 ± 0.05	-1.55
<i>all0865</i>			2.35 ± 0.12	2.09
<i>all0982</i>			1.59 ± 0.07	1.72

Figure 2.2. Semiquantitative RT-PCR analysis of the expression of genes encoding proteins with significant changes in abundance between wild-type strain PCC 7120 (WT) and *furA* overexpressing strain AG2770FurA (FurA⁺⁺). Total RNA was isolated from cells grown in standard BG-11 medium during the exponential phase of growth. Housekeeping gene *rnpB* was used as control. Determinations for each gene were performed in the exponential phase of PCR. Experiments were repeated at least twice, and the relevant portions of a representative gel are shown. Relative induction ratio was calculated as the ratio between signals observed in AG2770FurA and wild-type strains. The means of values obtained from two independent determinations ± SD are indicated. n.d., not determined.

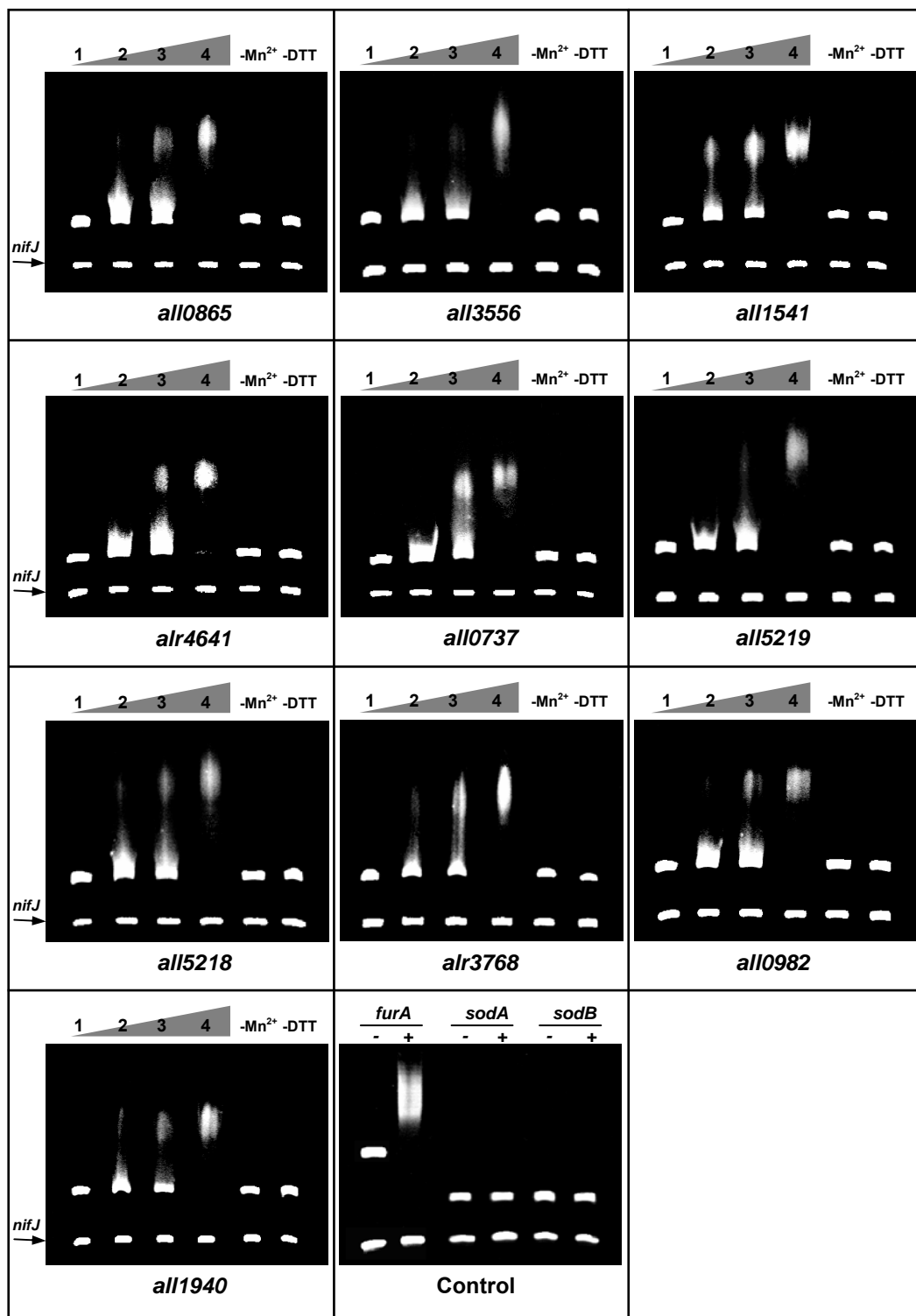


Figure 2.3. Electrophoretic mobility shift assays showing the ability of FurA to bind in vitro the promoter regions of direct target genes. DNA fragments free (1) or mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300 nM (2), 500 nM (3) and 700 nM (4) in the presence of Mn²⁺ and DTT were separated on a 4% PAGE. The impact of the metal co-repressor (removing Mn²⁺/adding EDTA) and reducing conditions (removing DTT) on the in vitro affinity of FurA (700 nM) to each target are also showed. Binding of FurA

(700 nM) to its own promoter, and to *Anabaena* sp. superoxide dismutases genes *sodA* and *sodB* promoters were included as controls. The promoter region of *nifJ* gene was used as non-specific competitor DNA in all assays.

As showed in Fig. 2.3, the EMSA experiments demonstrated that FurA could recognize and bind *in vitro* the promoters regions of all genes which had displayed significant changes in protein abundance and mRNA levels under a FurA overexpression background. Taking to account a positive result in both, RT-PCR and EMSA, we concluded that all of these genes constituted direct targets of FurA. As other so far recognized FurA targets, the specific binding of the regulator to these novel targets was strongly dependent on the presence of divalent metal ions and reducing conditions.

2.4.4 Searching for a functional FurA box sequence

Basing on previous and present results, we investigated the possibility of defining the putative iron box that governs the interaction of FurA with DNA in target promoters. The sequence alignment of the FurA target promoters described here and others so far identified revealed only minimal homology (data non shown). In order to define a putative functional FurA box sequence, we used the gold standard FurA target, its own promoter, and EMSA analyses were carried out with different 300- to 400-bp fragments of the *furA* promoter (Fig. 2.4A) resulting in a progressive binding affinity screening of short sequences within the overall 77-bp region protected by FurA in previous DNaseI footprinting assay.

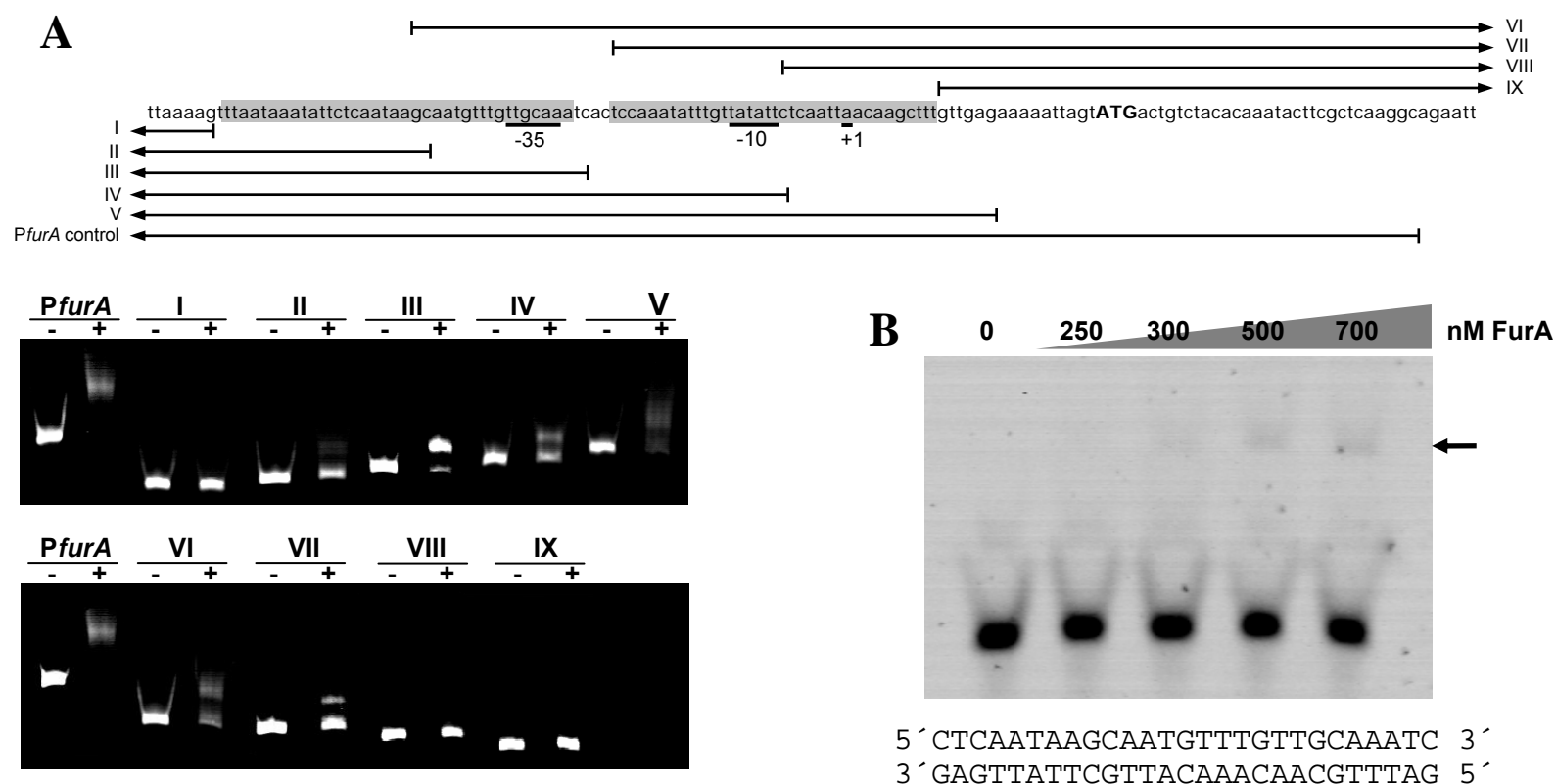


Figure 2.4. Electrophoretic mobility shift assays showing the ability of FurA to bind different regions within the *furA* promoter. (A) Nine DNA fragments of 300- to 400-bp, which progressively covered the entire DNaseI footprint region within the *furA* promoter (shaded in grey), were mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300 nM and separated on 4% PAGE. The complete *furA* promoter standardly used in binding assays (*PfurA*) was included as positive control in both gels. (B) A 27-bp synthetic DNA sequence containing the putative binding sites was mixed with 250 to 700 nM of recombinant FurA protein, please note that the image of ethidium bromide-stained gel was colour inverted in order to increase the sensitivity of detection. Slight formation of FurA-DNA complex is indicated by an arrow.

The EMSA results indicated that FurA bound with higher affinity to the promoter fragment III, which distinctively included an A/T-rich sequence that covers the -35 region. Interestingly, the FurA-fragment III complex yielded a retarded single defined band in EMSA gels, in contrast to the smeared bands observed with larger fragments or those commonly obtained with complete target promoters in FurA binding assays, a fact that could indicate the existence of secondary sites with less affinity that causes polymerization of the protein and extended DNA protection. However, gel retardation assays using a 27-bp synthetic DNA sequence containing the putative iron boxes showed only a quite feeble binding of FurA (Fig. 2.4B), suggesting that the regulator could not efficiently recognize its binding site in such short fragment. Thus, a proper DNA conformation that apparently takes place in fragment III seems to be necessary for efficient recognition and high affinity bindings, rather than a defined iron box sequence.

2.5 DISCUSSION

Comparative global analyses of the transcriptomes and proteomes for *fur* deletion mutants and their parental wild-type strains have been extensively used to characterize Fur regulons in several bacteria (Baichoo *et al.*, 2002; McHugh *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2004; Danielli *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008). However, gene knockout not always resulted in the method of choice to define gene function in the cell, especially in the case of essential genes, when silencing implies death. Overexpression of such genes, including transcriptional regulators, often leads to overcome this limitation and constitutes an alternative tool to describe functions, unravel mechanism of regulation or identify direct targets within regulatory networks (Agervald *et al.*, 2010; Liu & Golden, 2002; Olmedo-Verd *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004).

It is interesting to note that overexpression of FurA induced two different effects on the pattern expression of the direct target genes described here. Whereas some targets resulted down-regulated, as expected under a transcriptional repressor overexpression background, others appeared up-regulated. Previous studies show an up-regulating effect of FurA overexpression on the transcriptional pattern of well-recognized iron-responsive FurA direct targets, including the siderophore outer membrane transporter SchT and the iron stress-induced protein IsiA (González *et al.*, 2010). Since metal co-repressor appeared essential for the *in vitro* DNA-binding to these promoters, the observed up-regulating effect could result from a sudden decrease of the free iron pool in the cytosol by a “buffering” action of the overexpressed FurA protein. However, differences in the DNA binding affinity of FurA to different targets *in vivo*, as well as the possible combined action of other transcriptional regulators could influence the final expression pattern of FurA targets in the *furA*-overexpressing strain.

The most dramatic changes in protein abundance observed in the present work occurred in antioxidant enzymes. A marked repression of two peroxiredoxins (*alr4641* and *all1541*) in the *furA*-overexpressing strain was confirmed to be at the transcriptional level. Regulation of peroxiredoxins expression by Fur has been previously reported in heterotrophic bacteria (Lee *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2004). As other photosynthetic organisms which standardly produce substantial amount of reactive oxygen species as metabolic intermediaries, *Anabaena* is equipped with an array of antioxidant molecules including two superoxide dismutases, several peroxidases and catalases (Li *et al.*, 2002; Cha *et al.*, 2007). Peroxiredoxins, a superfamily of thiol-specific peroxidases which catalyse the reduction of a broad range of different peroxides including H₂O₂, alkyl hydroperoxides and peroxinitrite (Tripathi *et al.*, 2009), are specially abundant in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Cha *et al.*, 2007; Latifi *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2009). The down-regulation of antioxidant

enzymes under a FurA overexpression background observed here is consistent with previous results in physiological studies of the AG2770FurA strain, which reflected dramatic drops in both catalase and superoxide dismutase activities, as well as decrease in transcript levels of iron-containing superoxide dismutase SodB and the log-phase thiol-peroxidases GCT1 (*alr3183*) and GCT3 (*all2375*) (González *et al.*, 2010). However, neither promoters of superoxide dismutases nor those of GCT1/GCT3 peroxidases showed specific binding to FurA in EMSA analyses, suggesting an indirect mechanism of regulation orchestrated by FurA or the other two interconnected ferric uptake regulators of *Anabaena*, FurB and FurC (Hernández *et al.*, 2004a). By contrast, specific bindings to the promoters of the differentially expressed peroxiredoxins Alr4641 and All1541 were observed in the present study, indicating that these two proteins are direct targets of FurA. Taken together, the results of both studies with the strain AG2770FurA suggest the presence of different types of regulation of antioxidant enzymes expression via Fur in *Anabaena*. Other previously recognized direct targets of FurA with proved role in protecting cells from oxidative stress damage are the DpsA-homologue Alr3808 (Hernández *et al.*, 2007) and the DNA protecting protein FurB (López-Gomollón *et al.*, 2009).

Thioredoxin reductase TrxB (*all0737*) was also found to be significantly down-regulated in the AG2770FurA strain compared to the wild-type. Levels of TrxB transcripts showed a sensible reduction under a FurA overexpression background, while FurA specifically binds to the *trxB* promoter in EMSA. Notably, previous studies have also demonstrated specific binding of FurA to the thioredoxin (*trxA*) promoter (López-Gomollón *et al.*, 2007a). Thioredoxin, thioredoxin reductase and NADPH, known as the thioredoxin system, is an ubiquitous mechanism of redox regulation of protein function and signalling, but also a cell antioxidant that maintain the cytosol redox status (Arner & Holmgren, 2000; Koharyova &

Kolarova, 2008). Thioredoxins, with a dithiol/disulfide active site, are the major cellular protein disulfide reductases, serving as electron donors for a variety of enzymes and transcriptional factors, thereby modulating their activities. In plants and cyanobacteria, several photosynthetic enzymes are regulated by light via ferredoxin/thioredoxin, a redox regulatory cascade where ferredoxin receives reducing equivalents from the photosynthetic electron transport in the light and reduces Trx by means of ferredoxin-Trx reductase (Lindahl & Florencio, 2003). Like other member of the Fur family, the PerR regulator of *Staphylococcus aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001), FurA appears to have a direct regulatory role in transcription of genes for the thioredoxin system and thiol-peroxidases in *Anabaena*. Controlling the thioredoxin/thioredoxin reductase expression, FurA could regulate not only the expression of a variety of proteins and enzymes, but also indirectly modulate their functions in the cell, connecting thereby iron metabolism, redox signalling and oxidative stress defences.

Photosynthesis is a major iron-consuming process in phototrophic microorganisms. Iron is an essential component of every membrane-bound protein complex and other mobile electron carriers of the light reactions (Ferreira & Strauss, 1994). Considering the wide range of iron-deficiency mediated alterations in microbial photosynthesis and carbon metabolism, as well as the observed changes in photosynthesis-related gene expression patterns during iron limitation (Allen *et al.*, 2008; Ferreira & Strauss, 1994; Singh & Sherman, 2000), it is highly likely that iron-responsive transcriptional regulators directly mediate some of such adaptive responses. Previous studies have indicated direct FurA regulation on some photosynthesis genes expression. Specific *in vitro* binding of FurA to promoters of RuBisCo large subunit (*alr1524*), chlorophyll-binding protein IsiA (*all4001*), flavodoxin (*alr2405*) (López-Gomollón *et al.*, 2007a) and photosystem II reaction-center protein D1 (*alr3742*) (González *et al.*, 2010) has been clearly demonstrated by EMSA. In

the present work, the β -carboxysome shell protein CcmM (*all0865*), which forms two independently translated peptides of different sizes due to an internal ribosomal entry site within the *ccmM* transcript (Long *et al.*, 2010), appeared significantly up-regulated under a FurA overexpression background, while specific binding occurred in EMSA. Hence, Fur proteins in cyanobacteria play novel regulatory functions not previously described in heterotrophic bacteria.

Punctual mutations or knockout of fur genes have been usually reported to have pleiotropic effects (Friedman *et al.*, 2006; McHugh *et al.*, 2003; Staggs *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 2002). Similarly, *furA* overexpression in *Anabaena* sp. appeared to have a broad effect on gene expression profiles (González *et al.*, 2010). In the present study we observed significant changes in both protein abundance and mRNA levels for a variety of genes involved in different cellular processes including tricarboxylic acid cycle (*all3556*), DNA replication (*all5218* and *all5219*), signal transduction (*alr3768*), and thiamine biosynthesis (*all0982*). All of these genes showed specific binding to FurA in EMSA analyses.

Finally, we found an unexpected evidence of a putative FurA direct modulation of heterocyst differentiation under the nitrogen-replete conditions employed in our experiments. As a heterocyst-forming diazotrophic bacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120 provides a model for the study of nitrogen fixation and prokaryotic cell differentiation (Zhang *et al.*, 2006). Previous studies have demonstrated a cross-talk between FurA and the trigger regulator of the heterocyst differentiation process, NtcA, identifying overlapping genes in both regulons (López-Gomollón *et al.*, 2007a; López-Gomollón *et al.*, 2007b). Under combined nitrogen starvation, NtcA senses the increase of 2-oxoglutarate levels and activates its own transcription as well as a complicated regulatory cascade which results in the development of morphologically and physiologically differentiated cells specialized in nitrogen fixation called heterocysts

(Flores & Herrero, 2010). Heterocyst differentiation involves a chorus of metabolic signals, transcriptional regulators and enzymes. Like NtcA, some of the proteins implicated in this process are constitutively expressed under nitrogen-replete conditions, including the DNA binding proteins Abp1 (*all1940*) and Abp2 (*all1939*), denoted as a protease and a processing proteinase, respectively, due to their extensive similarity to proteins that have such roles in other bacteria (Koksharova & Wolk, 2002b). Abp1 and Abp2 are encoded by two closely spaced ORFs that may constitute an operon. Both proteins have demonstrated *in vitro* specific binding to an upstream sequence of *hepC*, while their deletion mutants showed developmental defects and a greatly reduced or slowed down expression of neighbouring genes *hepC* and *hepA*, required for the normal formation of the polysaccharide layer of heterocyst envelope (Koksharova & Wolk, 2002b). Here we observed a significant down-regulation of protease Abp1 under a FurA overexpression background, a phenotype which could resemble a natural iron stress response in *Anabaena*. Iron is important in heterocyst function because of its presence in several key enzymes of nitrogen fixation like nitrogenase, ferredoxin, and uptake hydrogenase. However, iron is also crucial for other essential processes like photosynthesis and respiration. Under iron limitation, the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* selectively sacrifices nitrogen fixation to conserve iron for photosynthetic and respiratory electron transport (Shi *et al.*, 2007). Similarly, in a context of iron deprivation, *Anabaena* appears to slow down the heterocyst differentiation in order to reduce iron-consuming processes and guarantee viability.

Little is currently understood about the sequences recognized by FurA within its target promoters. Previous DNaseI footprinting assays with promoters of two known FurA regulated genes, *furA* and *isiB*, revealed two quite near A/T-rich protected sites in both promoters covering a total region of 77- and 87-bp, respectively (Hernández *et al.*, 2006a).

With the increased number of FurA regulon components described so far, we further analyzed the architecture of sequences that could govern the binding of this transcriptional regulator to target promoters. A consensus DNA sequence for FurA binding was ill-defined, since the target promoters described here and other previously recognized shared only minimal homology. Furthermore, gel retardation assays failed to define a functional FurA box, whereas strong *in vitro* binding required large DNA fragments. Taking together, the results seem to suggest that FurA recognizes particular DNA structures of A/T rich sequences with characteristic local conformations, rather than a defined iron box sequence for proper regulation of its target genes, as occurs with Fur of *Helicobacter pylori* (Carpenter *et al.*, 2009). Little variations in these conformations would explain the different affinities observed *in vitro* with different targets, and could also explain how a simple protein controls the expression of a variety of genes with different functions.

To summarize, the comparative proteomic analysis presented here led to identify 10 novel direct targets of FurA involved in variety of cellular functions, including major cyanobacterial processes like photosynthesis and heterocyst differentiation. Although this study is not a full description of the regulon, the findings provide new evidences that FurA functions as a global transcriptional regulator in *Anabaena* sp. PCC 7120, unravelling novel regulatory functions of Fur proteins in cyanobacteria. Likewise, the results suggest that binding sites in DNA seems to be determined by secondary structures rather than by a defined iron box sequence.

CAPÍTULO 3

FurA es el regulador máster de la homeostasis del hierro en

***Anabaena* sp. PCC 7120**

González A, Bes T, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF.

FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120.

Environmental Microbiology 2012, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02897.x (*In press*).

3.1 ABSTRACT

Knowledge on the regulatory mechanisms controlling iron homeostasis in cyanobacteria is limited. In *Anabaena* sp. PCC 7120, the ferric uptake regulator FurA is a constitutive and essential protein whose expression is induced under iron deprivation. Our previous analyses have shown that this protein acts as a global transcriptional regulator, controlling the expression of several genes belonging to different functional categories, including *schT*, a gene coding for a TonB-dependent schizokinen transporter. In the present study we analyzed the impact of FurA overexpression and iron availability on the transcriptional modulation of a broad range of *Anabaena* iron uptake, transport, storage, and cellular iron utilization mechanisms, including enzymes involved in siderophore biosynthesis, TonB-dependent siderophore outer membrane transporters, siderophore periplasmic binding proteins, ABC inner membrane permeases, ferritin Dps family proteins, and enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis. By combining reverse transcription-PCR analyses, electrophoretic mobility shift assays and DNase I footprinting experiments, we defined a variety of novel direct iron-dependent transcriptional targets of this metalloregulator, including genes encoding at least five enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway. The results unravel the role of FurA as the master regulator of iron homeostasis in *Anabaena* sp. PCC 7120, providing new insights into the Fur regulons in cyanobacteria.

3.2 INTRODUCTION

The control of iron homeostasis in oxygenic photosynthetic organisms requires an effective balance between the use of iron as an essential nutrient and as a catalyser of reactive oxygen species (ROS) formation. Iron plays a critical role in photosynthetic electron transfer, serving as cofactor of every membrane-bound protein complex and other mobile electron carriers on the light reactions (Ferreira & Strauss, 1994). Thus, the demand for

iron far exceeds that of non-photosynthetic organisms, becoming in the main limiting factor of ocean primary productivity (Geider & La Roche, 1994). On the other hand, photosynthesis generates substantial amounts of hydrogen peroxide and superoxide which can interact with free iron producing hydroxyl radicals through Fenton chemistry (Shcolnick & Keren, 2006). In fact, both iron excess and iron starvation lead to significant increase in ROS and induce oxidative stress in cyanobacteria (Latifi *et al.*, 2005; Latifi *et al.*, 2009); therefore, iron homeostasis must be tightly regulated.

In response to iron limitation, cyanobacteria synthesize efficient siderophore-based systems to improve the scavenging of iron from the environment (Goldman *et al.*, 1983; Jeanjean *et al.*, 2008). Ferric-siderophore complexes are recognized, bound and translocated into the periplasm by TonB-dependent transporters in the outer membrane and then passed into the cytoplasm by ABC transporters in the cytoplasmic membrane (Mirus *et al.*, 2009; Nicolaisen *et al.*, 2008; Nicolaisen *et al.*, 2010). Internalised ferric iron is then reduced and dissociated from the siderophores (Andrews *et al.*, 2003). Once inside the cell, the metal is mostly used as cofactor (e.g., haem and Fe-S clusters) or incorporated into iron storage proteins like ferritins and bacterioferritins, in preparation for long periods of iron scarcity in habitats where its supply is often intermittent (Keren *et al.*, 2004; Shcolnick *et al.*, 2007; Shcolnick *et al.*, 2009).

Iron availability strongly influences biosynthesis of haem (Chauhan *et al.*, 1997), an abundant and ubiquitous iron-containing cyclic tetrapyrrole involved in many metabolic processes including respiration and oxygen metabolism, but specially important in cyanobacteria as the essential intermediate in the synthesis of phycobilins (Brown *et al.*, 1990). Enzymatic steps of haem metabolism are well characterized (Cornah *et al.*, 2003; Heinemann *et al.*, 2008; Layer *et al.*, 2010). Haem and chlorophyll share a common biosynthetic pathway from 5-aminolevulinic acid (ALA) to protoporphyrin IX. Haem is

synthesized from protoporphyrin IX by insertion of Fe^{2+} in a ferrochelatase-mediated reaction, whereas insertion of Mg^{2+} by magnesium chelatase is the first step of the chlorophyll branch. Haem is cleaved to biliverdin (BV) IX α by haem oxygenase as a degradation process in animals, but this reaction constitutes one more step of the bilins biosynthetic pathway in photosynthetic organisms. As occurs with iron, the accumulation of free haem as well as some of its biosynthetic intermediates is toxic by cause oxidative damage to cellular components (Vavilin & Vermaas, 2002), therefore tetrapyrrole synthesis pathway is tightly regulated by cell, and this regulation frequently depends of intracellular iron levels (Chauhan *et al.*, 1997; Taketani *et al.*, 2000).

Iron homeostasis is predominantly controlled in bacteria by a global transcriptional regulator known as Fur (ferric uptake regulator), which senses intracellular free iron and modulates transcription of iron uptake and storage machinery in response to iron availability (Escolar *et al.*, 1999). It is assumed that Fur works as a transcriptional repressor using Fe^{2+} as co-repressor under iron-replete conditions, and causing de-repression in the absence of Fe^{2+} under iron starvation (Andrews *et al.*, 2003). However, transcription of several genes has been shown to be directly or indirectly up-regulated by Fur, involving a variety of mechanisms (Delany *et al.*, 2004; Masse & Gottesman, 2002). Fur proteins have been described in several cyanobacterial strains like *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Ghassemian & Straus, 1996), *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Martin-Luna *et al.*, 2006a) and *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2004a); although *fur* orthologs are extensively found in almost so far annotated cyanobacterial genomes according to CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). As occurs with Fur from heterotrophic bacteria, cyanobacterial Fur proteins appears to function as global transcriptional regulators, controlling the expression of a plethora of genes including cyanotoxins (Martin-Luna *et al.*, 2006b), iron-stress proteins (Ghassemian & Straus, 1996),

photosynthesis and nitrogen metabolism (González *et al.*, 2010; López-Gomollón *et al.*, 2007a), zinc homeostasis (Napolitano *et al.*, 2012), among other transcriptional targets; but only FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 have been previously demonstrated to directly control the expression of at least one iron homeostasis gene, the TonB-dependent schizokinen transporter SchT (González *et al.*, 2010). Furthermore, a role as haem-sensor has been proposed for FurA based on the biochemical characterization of the FurA-haem complex (Pellicer *et al.*, 2012), whose ability to bind DNA is severely impaired (Hernández *et al.*, 2004b).

FurA is a constitutive protein whose expression increases under iron deprivation (Hernández *et al.*, 2002). As occurs with other cyanobacterial Fur homologues (Ghassemian & Straus, 1996), attempts to inactivate the gene *furA* have resulted in only a partial segregation of the mutated chromosomes, suggesting an essential role for this protein under standard culture conditions (Hernández *et al.*, 2006b). To partially overcome this limitation, we have previously obtained a strain of *Anabaena* sp. that overproduces active FurA by using a shuttle vector with the copper-responsive *petE* promoter fused to a *furA* gene copy. This approach has been successfully used to identify several FurA direct targets (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011). In the present study we have analysed the impact of FurA overexpression and iron availability on the transcriptional regulation of a broad range of *Anabaena* iron uptake, transport, storage, and cellular iron utilization mechanisms; unravelling the role of FurA as the master regulator of iron homeostasis, as well as providing first evidence that FurA directly controls the tetrapyrrole biosynthesis pathway in *Anabaena* sp. PCC 7120.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Bacterial strains and culture conditions

Wild-type *Anabaena* sp. PCC 7120 and its derivative *furA*-overexpressing strain AG2770FurA (González *et al.*, 2010) were routinely grown photoautotrophically in BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979) at 30°C, supplemented with neomycin 50 µg ml⁻¹ in the case of strain AG2770FurA. Cyanobacterial strains were cultured in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 60 ml culture medium under continuous white light illumination (20 µE m⁻² s⁻¹) and shaking (120 rpm). Chlorophyll *a* (Chl) was determined in methanol extracts (Nicolaisen *et al.*, 2008).

For iron depletion experiments, exponentially growing cells (3-5 µg Chl ml⁻¹) were harvested by centrifugation, washed three times with BG-11 medium without iron (BG-11-Fe), re-suspended in the same iron-free medium and further grown for 24 h. Glassware used in these experiments was soaked with 6 M HCl and extensively rinsed with Milli-Q water to remove residual iron.

3.3.2 Semiquantitative reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA from exponentially growing *Anabaena* sp. strains was isolated as described previously (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Samples of 1 µg RNA were heated at 85°C for 10 min and used as templates for the first strand cDNA synthesis. Residual DNA in RNA preparations was eliminated by digestion with RNase-free DNase I (Roche, Basel, Switzerland). The absence of DNA was checked by PCR. Reverse transcription was carried out using SuperScript retrotranscriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a 20 µl reaction volume containing 150 ng of random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 mM dNTP mix (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and 10 mM DTT. The sequences of the specific primers used for RT-PCR reactions are defined in Supporting Information

Table 3.S1. Housekeeping gene *rnpB* (Vioque, 1992) was used as a control to compensate for variations in the input of RNA amounts and normalize the results. Exponential phase of RT-PCR for each gene was determined by measuring the amount of PCR product at different time intervals. For the final results, 20-23 cycles at the early exponential phase were used in all genes analyzed. The PCR products were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and analyzed using a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Relative induction ratio for each gene was calculated as the ratio between signals observed in AG2770FurA and wild-type strains in at least two independent determinations. Signal assigned to each gene was corresponded to the intensity of its DNA band in the agarose gel stained with ethidium bromide normalized to the signal observed for the housekeeping gene *rnpB* in each strain.

3.3.3 Electrophoretic mobility shift assays

The promoter regions of each gene of interest were obtained by PCR using the primers described in Supporting Information Table 3.S1. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as described previously (Hernández *et al.*, 2006a). Briefly, 120-140 ng of each DNA fragment were mixed with recombinant FurA protein at concentrations of 300, 500 and 700 nM in a 20 μ l reaction volume containing 10 mM bis-Tris (pH 7.5), 40 mM potassium chloride, 100 μ g ml⁻¹ bovine serum albumin, 1 mM DTT, 100 μ M manganese chloride, and 5% glycerol. In some experiments, EDTA was added to a final concentration of 200 μ M. To insure the specificity of EMSA, the promoter region of *Anabaena* sp. *nifJ* (*aln1911*) gene (López-Gomollón *et al.*, 2007a) was included as non-specific competitor DNA in all assays. Mixtures were incubated at room temperature for 20 min, and subsequently separated on 4% non-denaturing polyacrylamide gels in running

buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine) at 90 V. Gels were stained with SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and processed with a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Table 3.S1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
<i>RT-PCR</i>	
rnpB_up	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG
rnpB_dw	AAAAGAGGAGAGAGTTGGTGG
all4145_up	GGCATCTCAAGGAACAATTAAC
all4145_dw	CCAGTAAACTTCTCAACATCCAAG
all1101_up	GCGTCCAATGGCTAGCAC
all1101_dw	CATCCCGGATTCCGTTGC
alr3242_up	GGAATCAATTCTCTCACCGTTACTC
alr3242_dw	GGTTCTATCTTGGTCATCTTG
all2610_up	GCTGAATTGCTGTCTCAAGTACC
all2610_dw	CGAAGTTAATCACACCACCAG
alr3240_up	CCATGACACCAGAACAATTGTG
alr3240_dw	GCGATAATCTGTGCCTACTAGTAAG
all2618_up	CCAATGTCAAGTTACAAACAACCTG
all2618_dw	CGTTCAATCGCATCTGGG
all2619_up	CAGTGACACGGTGTTTAATGTG
all2619_dw	GGCTGCGACCTCTTTCTAG
all2620_up	GCTCCTACAGTATTAGTTGATTGGG
all2620_dw	CCACCAGCAAACCAATCAC
fhuC_up	CACCTACGGTGATCGCATC
fhuC_dw	CTACGCCGAACACCTGCTG
all2648_up	GGTGTGGTGTAGAGGCTACTGTAC
all2648_dw	GGAACGGAACCTCCAGCTTTG
all2646_up	GCTTGGACAGCCTTAGAAGAC
All2646_dw	GCTGTTCCCTGTTCCGTGG
hemA_up	GCACAACCTACCAGCTATCCTC
hemA_dw	CCTGGACGTTGACCAGTTC
hemL_up	GACACTTTGATTCTGTACTTGTCCG

Table 3.S1. Primers used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')
hemL_dw	CTTTGTCTCCTTGGCGCAG
hemB_up	GGAGAAGGAATTGCTAACGAAG
hemB_dw	GCTGTTCATCAATCCAACCATTC
hemC_up	CGCTCTAGTTCAGACATACTGGG
hemC_dw	CCGTCTACACTAGCAACTACACC
hemD_up	GATTCTTATGCCACGATAGAAAC
hemD_dw	CAAGCAACAACACAATGCTGAAAC
haem_up	GTATCCTTCATTTGCGGATCG
haem_dw	CCAGCTTTGCGAACGGTATC
hemF_up	CGATCGCGTGTGCTACGTG
hemF_dw	CTCCAATCTTGGGGCTTGAG
hemK_up	GGCTGTTGCAAGAGATAGCTG
hemK_dw	GCCCTGTTGCAGCAGAAG
hemH1_up	CGATAAGCTGGAGGATGTAGC
hemH1_dw	CAGTATAGGGTTGTAGCCATTCAAC
hemH2_up	GGATTTATCCGCCGTTAGC
hemH2_dw	GCTGCTTGCTCTGCGTTG
HO1_up	GGAAGCTAGTGGCCAACCTTCTAC
HO1_dw	GAACAGCATCATGCCGATTG
HO2_up	CGATAGAGAAAGCTTCGCC
HO2_dw	GGGTTGAGGGTGCTAGTCAAG
EMSA	
PfurA_up	CTCGCCTAGCAATTTAACAAC
PfurA_dw	GCCTTGAGCGAAGTATTTGTC
PnifJ_up	GCCTACTCTGCGAGTTCTCCG
PnifJ_dw	GGCCTGTGAGAGTTGCTGCAC
Pall4145_up	CTAATGGAATCGATTGCAGC
Pall4145_dw	GCCATGTGTGTCTCCAAATTG
Pall1101_up	GGAGCTAACTGAGTCAATTTTATC
Pall1101_dw	CACGTTAGTAACTATGGCTTAGAAG
Palr3242_up	GTCGGTAATATATACATACGTAAG
Palr3242_dw	CTGCTGTGAACAAATAATATTC

Table 3.S1. Primers used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')
Pall2610_up	CGAAAGCGGAAGTTAGGAG
Pall2610_dw	GATTCACCGTACTCACCTC
Palr3240_up	GTCAAGTGGTAATTGCAACTTAAC
Palr3240_dw	GCTGTCGCTGCTTTAGTTTC
Pall2618_up	CTGGGGATTGGGAATTTATC
Pall2618_dw	GTCAGGTTTGAGCATGAGTATTTTC
Pall2619_up	GGTAGCAAACCTGCAGGCC
Pall2619_dw	CACCACCACTGAGAATTAATTG
Pall2620_up	CAGTTACTTTGCAGCTGCATTTTC
Pall2620_dw	GACTAGCCATAACTCCACACAAC
PfhuCD_up	CAACTTGCTAGCACCCCAATTTAC
PfhuCD_dw	CATCGCTGGCAATTCCTGAC
PfhuBhuCD_up	CCTCCGCGTTAACCTCTG
PfhuB_dw	CATTCCTGAAAGGGTGAGG
P1syntcluster_up	GCCTTAGACGAAACCAATCAAAC
P1syntcluster_dw	GGATGTCATATCAATATGTACTTACTC
P2syntcluster_up	CCCACCATCAACTCCCTAG
P2syntcluster_dw	CCGTTTATGCCAATTATTGC
P3syntcluster_up	CCACAAGAATTACTGGCAAATTTAG
P3syntcluster_dw	GTAGTAGTTTCGCTAATAGTTTCGC
P4syntcluster_up	CAAACCATCGCCACCTTAGC
P4syntcluster_dw	GGGTGATAGGGGATAGATATTTTC
PhemA_up	GACTAGGAAGCCAAGGAGCAG
PhemA_dw	CTGTCTGTGGTTCTGGAATACTC
PhemL_up	CTACAACCAACGCACCCAAAC
PhemL_dw	GCTGATGGCTGTTTGAATGAATG
PhemB_up	GCGATCGCTGATTTTCGTC
PhemB_dw	GTGTGTTGGAAACATAAAGTTTTG
PhemC_up	GAATCCAGTCAGTATGAAGGGG
PhemC_dw	GGCGATAATTTCACTCTCATCTAG
PhemD_up	CACTCATTATATATCCATGACTGGC
PhemD_dw	CACCCTTGCAGATAATTTGTG
Phaem_up	CTGATGCAACACGAGGTGAG
Phaem_dw	CCCATTAACTTCATCCTAAG

Table 3.S1. Primers used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')
PhemF_up	CACCAGAATGTTTCCATCAAG
PhemF_dw	CTGACTCTAGCTTTAGCGTCAG
PhemK_up	CTAGCAATAGGAGGAACGATTAG
PhemK_dw	CATAAGTATTCCCTCGTCTTAATGTG
PhemH1_up	GAAATCTAGCTTCTCCACCCAC
PhemH1_dw	GAATAGGTTAAATAGAAACGGAGC
PhemH2_up	GTCATTTGTCAGTTGTCATTGG
PhemH2_dw	GGCTACTCGGTCTTGGGTTG
POH1_up	CCTGACTTCAATAGTCGCCAGTAC
POH1_dw	GCTGCTCATACTAAATTTCTCAACC
POH2_up	GTGCTGAGTCGCCATTTCC
POH2_dw	GCTAGATTGCTACTCATTTTTGC

3.3.4 DNase I footprinting analysis

DNase I protection assays were performed as previously described (Valladares *et al.*, 2008). Protein-DNA complexes were formed in a final volume of 70 μ l of buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 0.07 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 0.07 mg ml⁻¹ poly(dIdC)], with 10 fmol of ³²P-end-labelled (with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP) DNA fragment, 1 mM ATP, and the reconstituted RNAP holoenzyme. The reaction mixtures were incubated for 30 min at 32°C. Then, 1 U DNase I (Roche, Basel, Switzerland) was added in a buffer containing 50 mM sodium acetate and 6 mM MgSO₄, and the reaction was immediately interrupted with 320 μ l of stop solution [0.5 mM EDTA, 0.125% SDS, 12.5 mM ammonium acetate (pH 5.2)]. The products were resolved in 6% polyacrylamide - 4.68 M urea gels next to the corresponding sequencing ladder. Radioactive bands were visualized with a Cyclone storage phosphor system and OptiQuant image analysis software (Packard Instrument, Meriden, CT, USA).

3.3.5 *In silico* analyses

Alignments of FurA binding sites were carried out using the AlignX software of the Vector NTI[®] suite (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Searching of putative Fur binding motifs was performed through the promoter analysis tool of the Virtual Footprint framework program (Munch *et al.*, 2005), using the pre-existing position weight matrices for Fur of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 / PAO1, and *Helicobacter pylori* ATCC 700392 / 26695. Sensitivity settings were varied up to 1. The relative conservation of nucleotides at their respective positions were calculated and graphically represented as sequence logo by using the WebLogo server at <http://weblogo.berkeley.edu> (Crooks *et al.*, 2004).

3.4 RESULTS

3.4.1 FurA overexpression blocks the induction of iron metabolism genes under iron-restricted conditions

Our previous studies have indicated that the *Anabaena* metalloregulator FurA transcriptionally modulated the expression of the outer membrane transporter for schizokinen, SchT (González *et al.*, 2010) and the iron-stress-induced protein IsiB (Hernández *et al.*, 2006a). In order to identify novel FurA targets involved in the control of iron homeostasis in *Anabaena* sp. PCC 7120, we analyzed the influence of *furA* overexpression on the transcriptional pattern of 9 different genes involved in several steps of iron uptake and assimilation, including enzymes implicated in synthesis of siderophores, TonB-dependent outer membrane ferric-siderophore transporters, ABC transporters of plasmatic membrane, and iron storage proteins. Changes in mRNA levels were determined by semiquantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). To obtain accurate determinations, each measure was performed at the early exponential phase of the PCR of

each gene. The *rnpB* housekeeping gene was included in all RT-PCR analyses to ensure that equivalent amounts of total RNA were being used in all reactions.

As shown in Fig. 3.1 and Table 3.1, all of the iron metabolism players analyzed in the study resulted transcriptionally induced to a greater or lesser extent in the *Anabaena* wild-type strain exposed to iron deprivation. As expected, the overexpression of *furA* under iron-replete conditions slightly induced the transcription of iron-responsive genes, a result previously observed with *schT* and other FurA direct targets (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011), probably as consequence of a sudden reduction of the free iron pool in the cytosol by a “buffering” action of the overexpressed FurA protein. However, the inducible effect of iron starvation observed in the wild-type strain resulted clearly affected by the overexpression of FurA in all genes analyzed (Table 3.1). Thus, under a FurA overexpression background, the amount of active FurA-Fe²⁺ complexes seems to result sufficient to overrepress the transcription of iron-responsive FurA targets, even after exogenous iron limitation.

3.4.2 FurA is the master transcriptional regulator of iron metabolism in *Anabaena* sp.

To determine whether the expression of genes previously analyzed by RT-PCR was directly regulated by FurA, we investigated the ability of recombinant FurA to bind *in vitro* the promoter regions of such genes by EMSA. In the case of enzymes involved in siderophore biosynthesis, whose genes are arranged in a cluster of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Jeanjean *et al.*, 2008), we analyzed the ability of FurA to specifically bind to different potential promoters located at different points in this nine-gene cluster, denoted by P1 to P4.

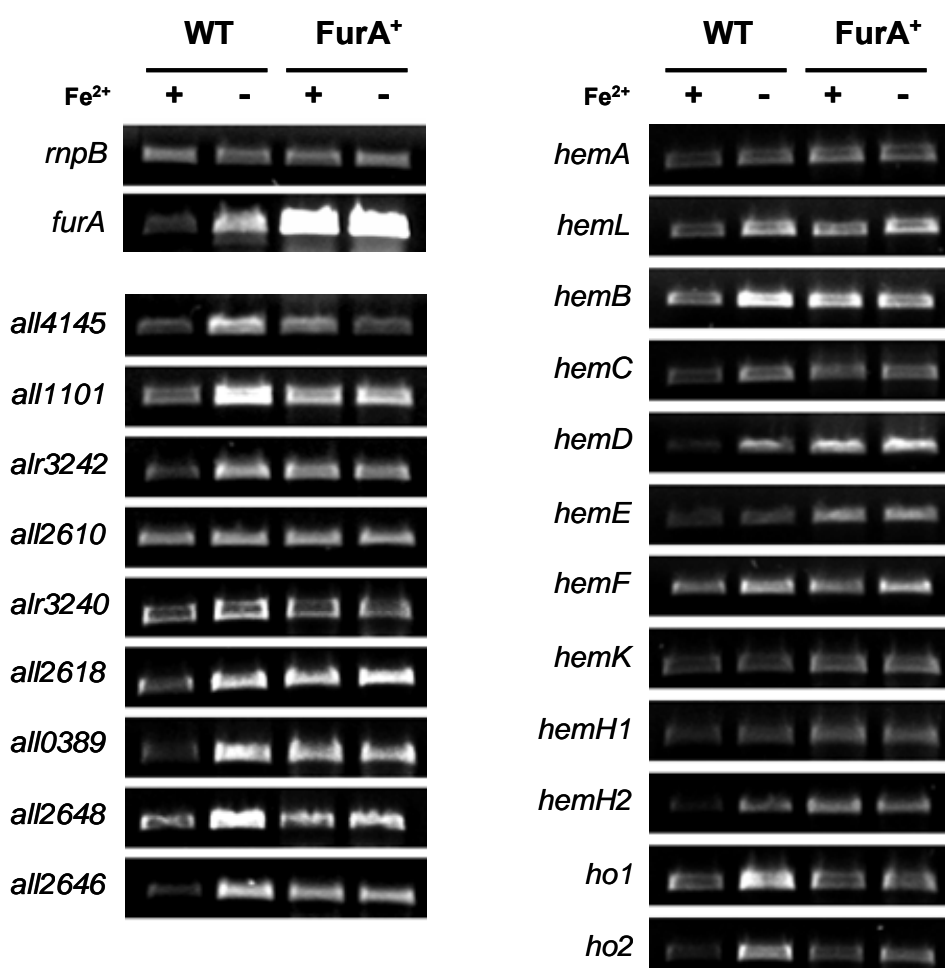


Figure 3.1. Semi-quantitative RT-PCR analyses showing the impact of FurA overexpression and iron availability on the transcriptional pattern of several genes involved in iron metabolism and tetrapyrrole biosynthesis. Total RNA from wild-type strain PCC 7120 (WT) and *furA* overexpressing strain AG2770FurA (FurA⁺) were isolated from cells grown in standard BG-11 medium (+Fe²⁺) or iron deprived medium BG-11. Fe (-Fe²⁺). Housekeeping gene *rnpB* was used as control. Determinations for each gene were performed in the early exponential phase of PCR. Experiments were repeated at least twice with independent RNA extractions, and the relevant portions of a representative gel are shown. Relative induction ratios are shown in Tables 3.1 and 3.2.

Table 3.1. Relative induction ratio of selected iron metabolism genes under each experimental condition, in relation to the wild-type strain PCC 7120 grown under standard conditions (BG11 medium), as result of semiquantitative RT-PCR analyses^a

Gene ID ^b	Protein description ^b	WT _(-Fe) /	FurA ⁺ _(+Fe) /	FurA ⁺ _(-Fe) /
		WT _(+Fe)	WT _(+Fe)	WT _(+Fe)
<i>all1691</i>	Ferric uptake regulator, FurA	4.06 ± 0.16	32.11 ± 1.27	32.63 ± 1.34
<i>all4145</i>	Ferritin, Dps family protein	3.45 ± 0.02	1.65 ± 0.01	0.95 ± 0.04
<i>all1101</i>	TonB-dependent ferrichrome iron receptor	6.94 ± 0.08	1.93 ± 0.18	2.00 ± 0.13
<i>alr3242</i>	TonB-dependent haem receptor	2.97 ± 0.07	2.27 ± 0.02	2.01 ± 0.04
<i>all2610</i>	TonB-dependent ferrichrome iron receptor	1.24 ± 0.02	1.22 ± 0.04	1.07 ± 0.01
<i>alr3240</i>	Ferrichrome ABC transporter, permease	1.80 ± 0.03	1.15 ± 0.01	1.07 ± 0.01
<i>all2618</i>	Iron (III) dicitrate-binding periplasmic protein	1.87 ± 0.01	1.67 ± 0.02	1.75 ± 0.01
<i>all0389</i>	Iron (III) ABC transporter	2.70 ± 0.04	1.75 ± 0.04	1.84 ± 0.01
<i>all2648</i>	Peptide synthetase	4.49 ± 0.04	1.25 ± 0.06	1.75 ± 0.03
<i>all2646</i>	Polyketide synthase type I	2.45 ± 0.64	2.17 ± 0.01	1.96 ± 0.04

^aSignal assigned to each gene corresponded to the intensity of DNA band in the agarose gel stained with ethidium bromide, normalized to the signal observed for housekeeping gene *rnpB* in each condition. Values are means of two independent determination ± SD.

^bGene identification and protein description according to the cyanobacterial genomes database CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>).

As showed in Fig. 3.2, the EMSA experiments demonstrated that FurA specifically recognized and bound *in vitro* the promoter regions of all iron-responsive genes analyzed. In the case of the NRPS-PKS gene cluster, gel retardation assays showed that FurA bound with higher affinity to the promoter region denoted as P1, located most upstream at the cluster, in the promoter region of gene *all2649*. *In vitro* bindings to P2, P3 and P4 also occurred, but with less affinity. Taking into account a positive result in both, RT-PCR and EMSA, we concluded that all of iron metabolism genes analyzed were direct transcriptional targets of FurA, indicating a broad regulatory role of FurA on iron uptake and assimilation mechanisms.

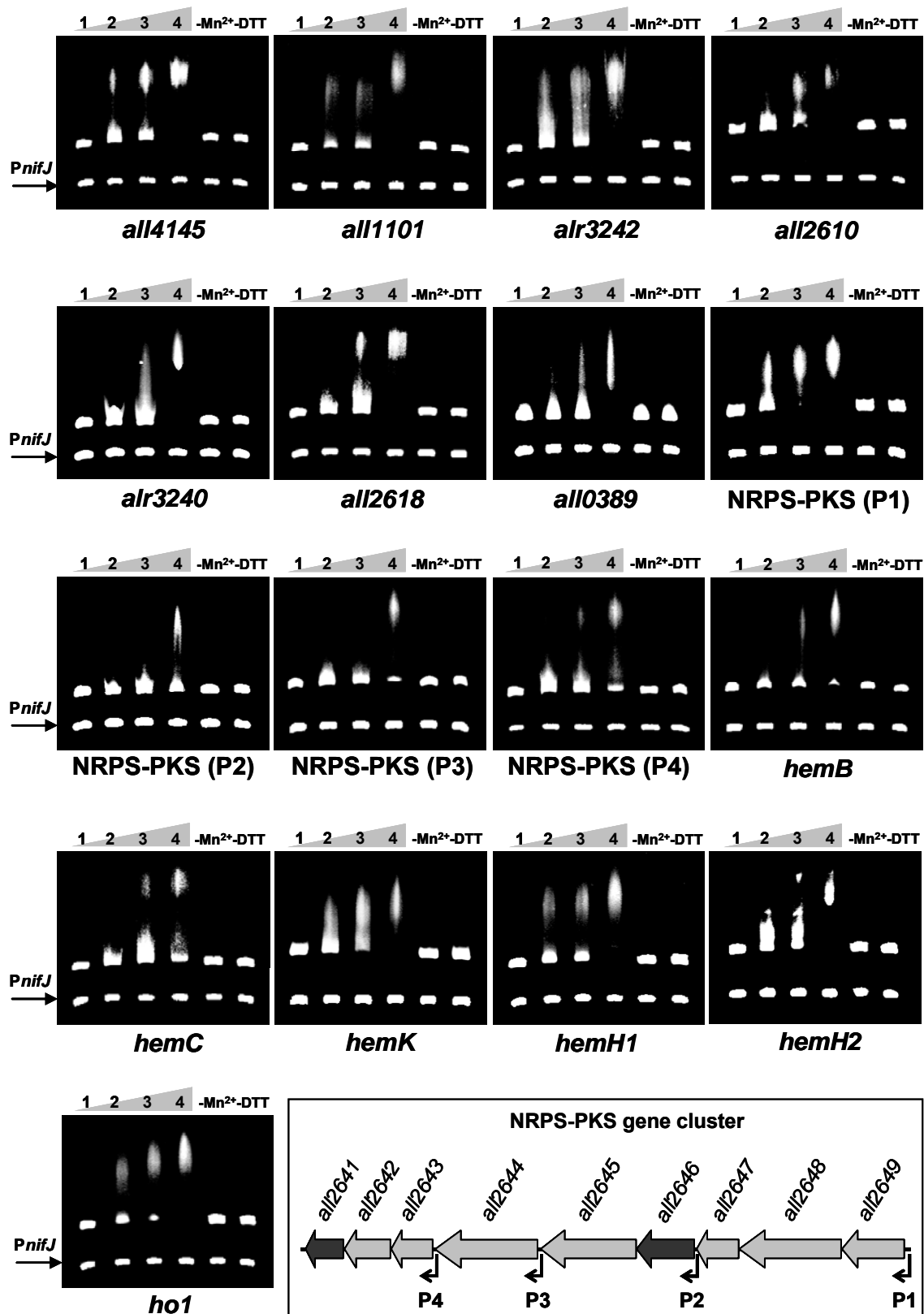


Figure 3.2. Electrophoretic mobility shift assays showing the ability of FurA to bind *in vitro* the promoter regions of new direct target genes involved in iron metabolism and tetrapyrrole biosynthesis. DNA fragments free (1) or mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300 nM (2), 500 nM (3) and 700 nM (4)

in the presence of Mn^{2+} and DTT were separated on a 4% PAGE. The impact of the metal co-repressor (removing Mn^{2+} /adding EDTA) and reducing conditions (removing DTT) on the *in vitro* affinity of FurA (700 nM) to each target are also showed. The promoter region of *nifJ* gene was used as non-specific competitor DNA in all assays. The genomic structure of the *Anabaena* sp. PCC 7120 gene cluster encoding non-ribosomal peptide synthetases (light grey arrows) and polyketide synthases (dark grey arrows) involved in the synthesis of siderophores, as well as the non-coding intergenic regions considered as potential promoters and evaluated by EMSA (denoted by P1, P2, P3, and P4) are shown in the box.

As other so far recognized FurA targets, the specific binding of the metalloregulator to these novel targets was strongly dependent on the presence of divalent metal ions and reducing conditions. Mn^{2+} ions are routinely used in Fur binding experiments instead of Fe^{2+} ions because of their greater redox stability, while the same amounts of both divalent ions have similar effect on *in vitro* Fur biological activity (Delany *et al.*, 2001). Hence, the *in vitro* results suggest an iron-dependent regulation of FurA on its transcriptional targets and, additionally, this iron-dependent affinity results clearly affected by oxidative signals, confirming the previous recognized connection between iron homeostasis and oxidative stress in the cyanobacterial cell.

DNase I protection footprinting assay on the P1 promoter of the NRPS-PKS gene cluster was carried out with purified recombinant FurA using binding conditions similar to those employed in EMSA experiments (Fig. 3.3). A window of protection due to FurA binding was observed covering an A/T rich 28 nucleotide (nt) region, spaced 86 nt upstream to the translational start point of the *all2649* gene.

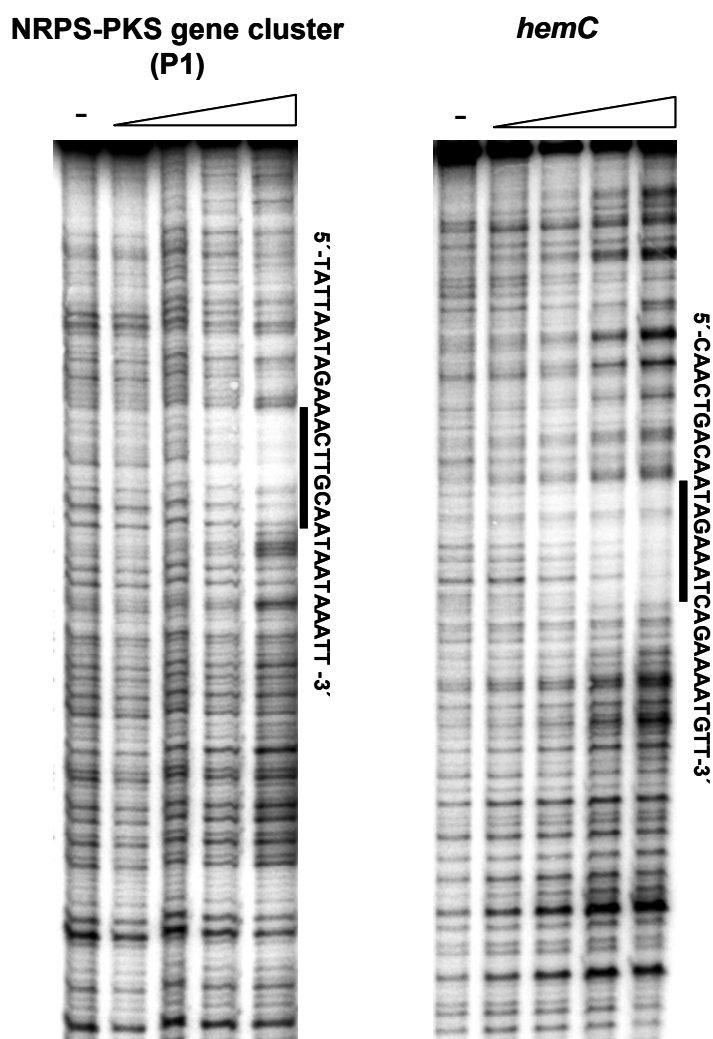


Figure 3.3. Sequences into the NRPS-PKS gene cluster promoter region P1 and the *hemC* promoter protected by FurA. DNase I protection footprint assays were carried out with 5 fmol of ^{32}P -end-labelled 300-400 bp DNA fragment and 100, 200, 300 and 500 nM of purified recombinant FurA in the presence of 100 μM MnCl_2 and 1 mM DTT. Windows of protection due to FurA binding are indicated by thick vertical lines.

3.4.3 Iron deprivation transcriptionally induces enzymes involved in haem metabolism

Because the synthesis of haem results in one of the most relevant iron utilization route into the cell and it constitutes an essential intermediate to phycobilin biosynthesis in

cyanobacteria, we analyzed the effect of iron deprivation on the transcriptional profiles of haem metabolism enzymes in *Anabaena* sp. PCC 7120 by means of RT-PCR. As expected, iron deprivation resulted in up-regulation of transcription of enzymes involved in haem degradation and subsequent release of iron, the haem-oxygenases I (*ho1*) and II (*ho2*). But curiously, limitation of iron in the wild-type strain of *Anabaena* sp. additionally triggered transcriptional induction of all haem biosynthesis enzymes (Fig. 3.1). However, the increase of transcript abundance of haem metabolism enzymes observed in the cyanobacterium after iron limitation was not homogenous in all genes (Table 3.2). Hence, while appreciable increase in transcript abundance was observed in some *hem* genes like *hemB* or *hemD*, other genes like *hemK* displayed a less marked induction after iron deprivation. These results suggest the existence of different ways of transcriptional regulation and possibly the coordination of multiple transcription-control mechanisms acting on each individual gene of tetrapyrrole biosynthesis pathway under the same environmental condition. These findings additionally indicated that in contrast to non-photosynthetic organisms where iron deprivation usually results in the repression of iron-consuming pathways including haem biosynthesis, the increased degradation of haem in *Anabaena* sp. PCC 7120 as iron source under iron-limited conditions transcriptionally induced the enzymes involved in its own biosynthesis, maybe as feedback homeostatic control in an attempt to maintain haem and phycobilins levels.

3.4.4 FurA overexpression induces changes in the transcriptional pattern of haem metabolism enzymes

As the master transcriptional regulator of iron homeostasis in *Anabaena* sp., we examined the influence of FurA on the transcriptional pattern of enzymes involved in the metabolism of one of the most important iron-containing molecules, the haem cofactor. Overexpression

of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 produced different effects on the transcriptional pattern of haem metabolism enzymes (Fig. 3.1).

Table 3.2. Relative induction ratio of selected haem metabolism genes under each experimental condition, in relation to the wild-type strain PCC 7120 grown under standard conditions (BG11 medium), as result of semiquantitative RT-PCR analyses^a

Gene ID ^b	Synon	Protein description ^c	WT ^(-Fe) /	FurA ^(+Fe) /	FurA ^(-Fe) /
			WT ^(+Fe)	WT ^(+Fe)	WT ^(+Fe)
<i>all1691</i>	<i>furA</i>	Ferric uptake regulator	4.06 ± 0.16	32.11 ± 1.27	32.63 ± 1.34
<i>alr1042</i>	<i>hemA</i>	Glutamyl-tRNA reductase	1.55 ± 0.04	1.64 ± 0.01	1.56 ± 0.02
<i>all2638</i>	<i>hemL</i>	Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase	2.93 ± 0.01	1.92 ± 0.04	2.87 ± 0.06
<i>alr4380</i>	<i>hemB</i>	Porphobilinogen synthase	4.58 ± 0.07	2.90 ± 0.07	2.00 ± 0.04
<i>alr1878</i>	<i>hemC</i>	Porphobilinogen deaminase	1.99 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.28 ± 0.01
<i>all0287</i>	<i>hemD</i>	Uroporphyrinogen III synthase	4.15 ± 0.03	6.35 ± 0.06	8.40 ± 0.02
<i>all3909</i>	<i>haem</i>	Uroporphyrinogen III decarboxylase	1.43 ± 0.01	3.22 ± 0.13	2.88 ± 0.06
<i>all0650</i>	<i>hemF</i>	Coproporphyrinogen III oxidase	2.00 ± 0.01	1.31 ± 0.04	1.99 ± 0.01
<i>alr0115</i>	<i>hemK</i>	Protoporphyrinogen IX oxidase	1.12 ± 0.05	1.54 ± 0.02	1.53 ± 0.01
<i>alr3751</i>	<i>hemH1</i>	Ferrochelatase	1.62 ± 0.09	2.03 ± 0.15	1.85 ± 0.16
<i>alr4616</i>	<i>hemH2</i>	Similar to Ferrochelatase	2.73 ± 0.01	4.50 ± 0.03	2.97 ± 0.01
<i>all1897</i>	<i>ho1</i>	Haem oxygenase I	2.31 ± 0.04	1.16 ± 0.01	0.96 ± 0.04
<i>alr3125</i>	<i>ho2</i>	Haem oxygenase II	2.37 ± 0.04	1.11 ± 0.03	1.23 ± 0.01

^aSignal assigned to each gene corresponded to the intensity of DNA band in the agarose gel stained with ethidium bromide, normalized to the signal observed for housekeeping gene *rnpB* in each condition. Values are means of two independent determination ± SD.

^bGene identification according to the cyanobacterial genomes database CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>).

^cProtein description according to the nomenclatures proposed by CyanoBase and NC-IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>).

Several of these genes, including *hemB*, *hemC*, *ho1* and *ho2* displayed a transcriptional pattern change similar to those observed in previously analyzed genes coding for iron homeostasis players, where *furA* overexpression reduced the inducible effect of iron starvation observed in the wild-type strain. However, the overexpression of the metalloregulator led to an appreciable induction on transcription of other *hem* genes; thus, transcript abundances of *hemD*, *haem*, *hemK* and *hemH* were significantly increased under a *furA* overexpression background (Table 3.2). In most of those genes, iron deprivation slightly affected the transcriptional induction observed with FurA overexpression under iron-replete conditions; while in the case of *hemD*, overexpression of Fur and iron starvation seemed to exert a synergistic inducible effect on transcription. On the other hand, transcription of several *hem* genes appeared to occur independently of FurA or at least, the regulatory influence of this protein was only partial, indirect or cooperatively acting with other transcriptional factors. Thus, the transcript levels of *hemA*, *hemL* or *hemF* under a *furA* overexpression background were similar to those observed in the wild-type after iron-deprivation.

3.4.5 FurA regulates both synthesis and degradation of haem

The regulation of haem biosynthetic pathway, which shares most enzymes with synthesis of chlorophyll and constitutes also the initial steps of phycobilin biosynthesis, is quite complex and subject to several controls at different levels. Therefore, all the transcriptional changes observed in genes coding for the enzymes involved in both biosynthesis and degradation of haem under a *furA* overexpression background did not necessarily reflect a direct regulatory role of FurA on the transcription of such enzymes, since some of those transcriptional changes could be a result of pleiotropic effects of *furA* overexpression.

In order to define which enzymes involved in haem metabolism were direct targets of FurA, we analyzed the ability of recombinant FurA to bind *in vitro* the promoter regions of all *hem* genes as well as those of the two haem-oxygenases described in *Anabaena* sp. by using EMSA. As previously performed with iron metabolism genes, different binding conditions were analyzed for all genes tested to verify thereby all possible reaction environments that could modify the *in vitro* affinity of FurA to potential new transcriptional targets.

The EMSA experiments indicated that FurA specifically bound to the promoter regions of four haem-biosynthesis enzymes encoding genes: *hemB*, *hemC*, *hemK* and *hemH* (Fig. 3.2), as well as to the promoter of the haem-degrading enzyme haem-oxygenase I (*hoI*). None of the other analyzed haem metabolism genes showed specific binding to FurA according to EMSA (data not shown). Consistently with an iron-dependent regulation, the *in vitro* affinity of FurA for these new identified targets was markedly affected in the absence of divalent metal ions and/or reducing agents, as occurs with all so far described FurA transcriptional targets (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2006a), suggesting a critical role of metal co-repressor and reducing conditions to the function of this cyanobacterial metalloregulator *in vivo*.

DNase I footprinting analysis was carried out with purified recombinant FurA using binding conditions similar to those employed in EMSA experiments in order to determine the FurA-binding site within the promoter of *hemC*. As shown in Fig. 3.3, a window of protection covering 28 nt into the *hemC* promoter and spaced 102 nt upstream the translational start site was clearly observed.

Taken together, the combination of RT-PCR analyses and EMSA experiments led us to identify five novel FurA direct targets involved in tetrapyrrole biosynthesis (Fig. 3.4): the genes encoding haem-biosynthesis enzymes porphobilinogen synthase (*hemB*),

porphobilinogen deaminase (*hemC*), protoporphyrinogen oxidase (*hemK*) and ferrochelatase (*hemH*), but also the gene encoding haem-oxygenase I (*hoI*). Notably, two distinguishable transcriptional pattern changes were observed for these new direct targets in relation to FurA levels and iron availability. The findings suggest a dual role of FurA in the transcriptional regulation of the tetrapyrrole biosynthesis pathway, as iron-dependent transcriptional repressor of *hemB*, *hemC* and *hoI*, but also as iron-dependent activator of *hemK* and *hemH*, a phenomenon previously observed with other transcriptional regulators controlling this metabolic pathway (Zappa *et al.*, 2010).

3.4.6 Bioinformatic analysis of footprinted FurA binding sites reveals a putative regulatory consensus for iron-responsive genes

The sequences of eight FurA binding sites identified by DNase I footprinting analysis of six different iron-responsive gene promoters were aligned in order to define a regulatory consensus. Despite the length of the regions protected by FurA varied in different promoters, a well-conserved 26 bp A/T-rich consensus was clearly obtained (Fig. 3.S1). A search of recognized Fur binding motifs into this consensus was carried out using the promoter analysis tool of the Virtual Footprint software suite (Munch *et al.*, 2005), employing all the pre-existing weight matrices belonging to Fur proteins of the PRODORIC library (Munch *et al.*, 2003). Accordingly, three Fur binding octamer (8-mer) motifs in a head-to-head-to-tail array were identified covering 23 of the 26 bp consensus initially obtained by the alignment. Therefore, only this 23 bp sequence (TGATAAAAATTCTCAATAAATAA) was defined as the final putative FurA regulatory consensus (Fig. 3.5).

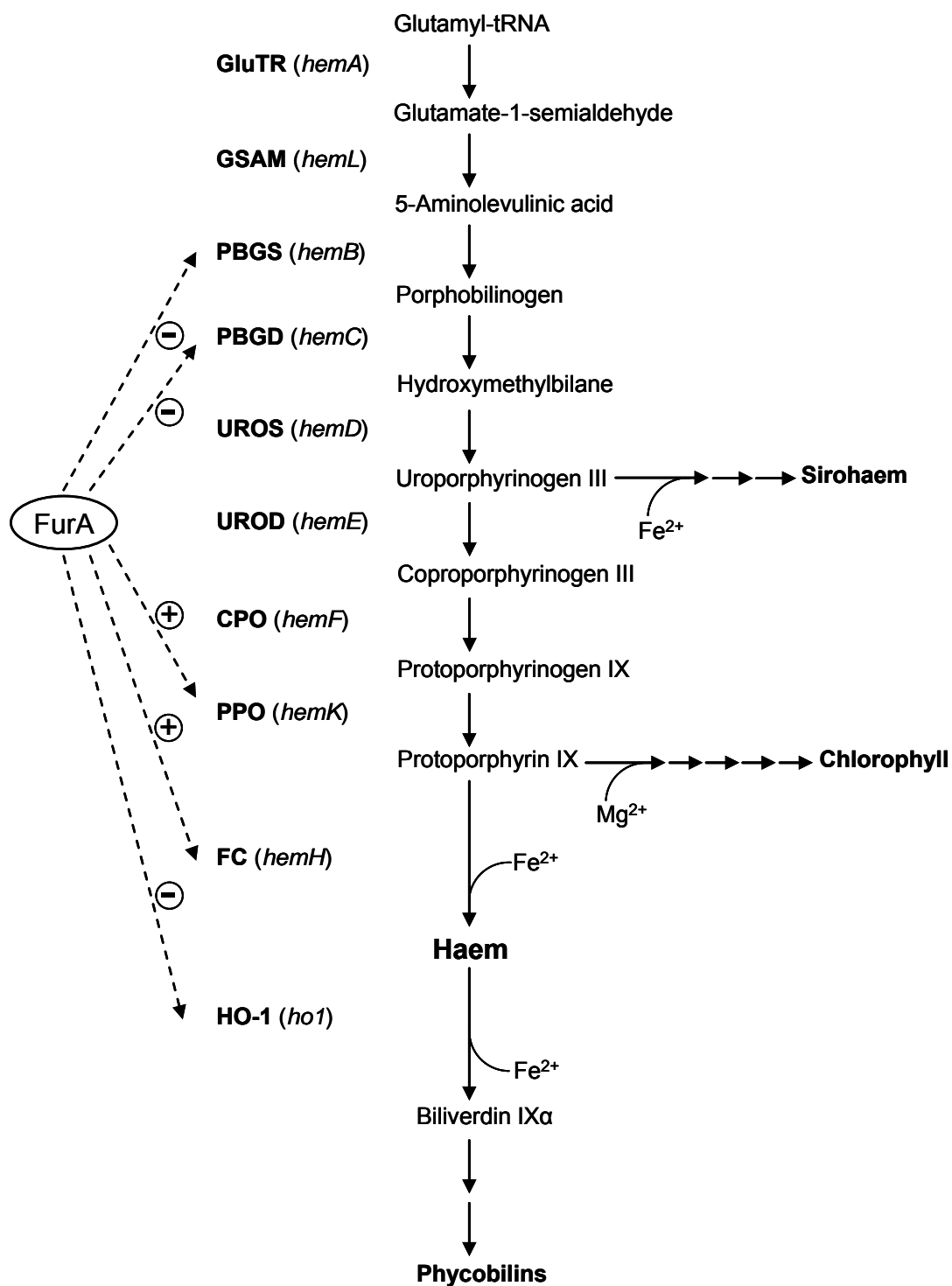


Figure 3.4. Model of tetrapyrrole biosynthesis regulation by FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120. The dual role of FurA as transcriptional repressor of *hemB*, *hemC* and *ho1*, but also as transcriptional activator of *hemK* and *hemH* is indicated. The full names of the enzymes are shown in Table 3.2.

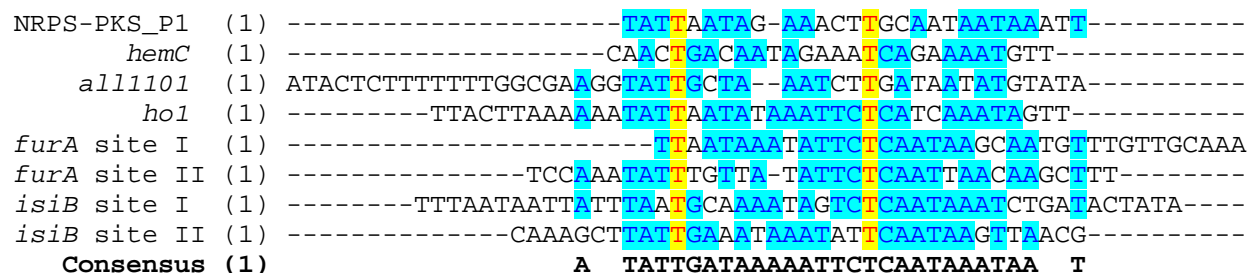


Figure 3.S1. Sequence alignment of FurA binding sites identified by DNase I footprinting analysis of six iron-responsive gene promoters

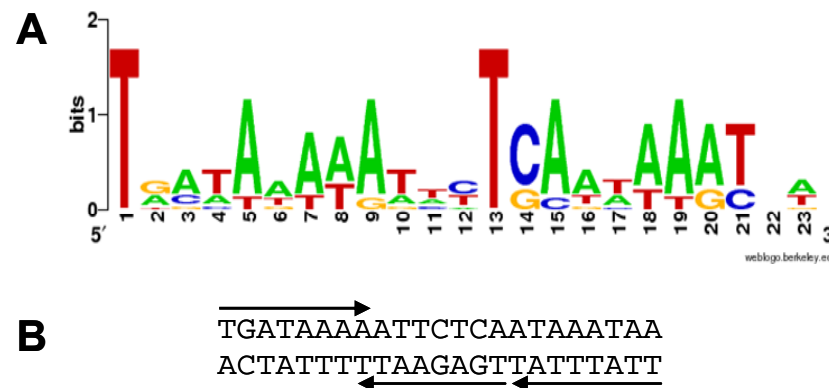


Figure 3.5. The putative FurA regulatory consensus in *Anabaena* sp. PCC 7120. (A) The sequence logo created with the WebLogo server (<http://weblogo.berkeley.edu/>) was drawn from eight different FurA binding sites identified by DNase I footprinting analysis of six iron-responsive target promoters. The degree of sequence conservation at each position is indicated as a total height of a stack of letters, measured in arbitrary "bit" units, with two bits possible at each position. (B) Putative Fur binding motifs identified by Virtual Footprint (Munch *et al.*, 2005) are indicated by arrows.

3.5 DISCUSSION

Despite the number of studies that have been undertaken on cyanobacterial response to iron deficiency (Alexova *et al.*, 2011; Ferreira & Strauss, 1994; Shi *et al.*, 2007; Singh & Sherman, 2000; Singh *et al.*, 2003), as well as the increasing identification of iron uptake and storage players (Goldman *et al.*, 1983; Keren *et al.*, 2004; Mirus *et al.*, 2009; Nicolaisen *et al.*, 2008; Shcolnick *et al.*, 2007), knowledge on the regulating mechanisms of iron homeostasis in cyanobacteria is limited (Nodop *et al.*, 2008; Shcolnick *et al.*, 2009). In the filamentous diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, three Fur homologues have been described (Hernández *et al.*, 2004a), although only FurA seems to be directly involved in control of iron metabolism (González *et al.*, 2010). In this study, we unravel the role of FurA as the master regulator of iron metabolism analyzing the impact of FurA overexpression and iron availability on the transcriptional modulation of a broad range of *Anabaena* iron uptake, transport, storage, and cellular iron utilization mechanisms.

In cyanobacteria, siderophore-mediated iron uptake is thought to be an evolutionary advance that contributes to dominate iron-limited environments. *Anabaena* sp. PCC 7120 synthesizes schizokinen as its major siderophore, although iron uptake from aerobactin and ferrioxamine B has also been reported (Goldman *et al.*, 1983). The biosynthesis of siderophores is presumably mediated by a cluster of nine open reading frames, from *all2641* to *all2649*, encoding seven non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) and two polyketide synthases (PKSs) which are transcriptionally activated under iron limitation or oxidative stress conditions (Jeanjean *et al.*, 2008). The comparative analysis of gene expression of two of these enzymes (*all2646* and *all2648*) in the *Anabaena* wild-type strain PCC 7120 and the *Anabaena* sp. *furA*-overexpressing strain AG2770FurA displayed a typical iron-responsive FurA-repressed transcriptional pattern. Both enzymes were

strongly induced in the wild-type strain under iron-restricted conditions, but the inducible effect of iron starvation was partially reduced under a FurA overexpression background, where the increased amount of the transcriptional repressor hinders the complete down-regulation of its targets. Recombinant FurA protein specifically bound to at least four intergenic regions into this nine-gene NRPSs-PKSs cluster.

Siderophore-iron complexes are bound by outer membrane receptor proteins, the TonB-dependent transporters (TBDTs), which are composed of a transmembrane β -barrel domain that encloses a globular plug domain, and a periplasmic exposed TonB box (Noinaj *et al.*, 2010). Bacteria often possess multiple TBDT receptors, each providing the bacterium with specificity for different siderophores. These outer membrane receptors are generally induced by iron starvation and usually are not present or poorly expressed under iron-sufficient conditions (Andrews *et al.*, 2003). Twenty-two TBDTs have been identified in the genome sequence of *Anabaena* sp. PCC 7120, most of them integrated into gene clusters or even putative operons containing genes coding for proteins involved in iron transport (Mirus *et al.*, 2009). Our previous results have shown that the *alr0397* gene, coding for a schizokinen TBDT (Nicolaisen *et al.*, 2008), is a direct transcriptional target of FurA (González *et al.*, 2010). The analysis of gene expression of the ferrichrome-type TBDT coding genes *all2610* and *all1101*, and the *hutA*-like haem TBDT coding the *alr3242* gene in response to iron deprivation and/or FurA overexpression carried out in the present study suggests an iron-dependent FurA regulation on the transcription of these three TBDT; in all cases, the inducible effect of iron starvation observed in the wild-type strain was partially reduced under a FurA overexpression background. Functional involvement of FurA was further confirmed by EMSA. A similar pattern of gene expression and EMSA results were also observed with the *alr3240*, *all2618* and *all0389*

genes, encoding periplasmic and inner membrane ABC transporter proteins involved in translocation of siderophore-iron complexes from periplasm to cytosol.

Due to the poor bioavailability of iron and its frequent intermittent supply in nature, bacteria have developed efficient iron storage mechanisms involving ferritins and bacterioferritins (Andrews, 1998), ubiquitously multi-subunit proteins that can accommodate up to 4500 iron atoms into a central cavity in a form that is unlikely to participate in ROS generation reactions (Theil, 1987). In *Synechocystis* sp. PCC 6803, bacterioferritins BfrA and BfrB are responsible for the storage up to 50% of intracellular iron content (Keren *et al.*, 2004), while the DPS family ferritin MrgA plays a critical role in the mobilization of the stored iron within the cell (Shcolnick *et al.*, 2007). By contrast, little is known about the mechanisms of iron storage in *Anabaena* species. Only four nonhaem-binding ferritin family genes have been identified in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Keren *et al.*, 2004), including *alr3808*, a DNA-binding protein homologue to DpsA from *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Peña & Bullerjahn, 1995) which appears transcriptionally regulated by FurA (Hernández *et al.*, 2007). DpsA displayed a weak catalase activity *in vitro* and is presumably involved in peroxide-consuming mechanism located on the chromosomal DNA, conferring resistance to peroxide damage during oxidative stress conditions or long term nutrient limitation (Peña & Bullerjahn, 1995). The results presented here give evidence that FurA additionally modulates the expression of another DPS family protein, encoded by gene *all4145*, which shares more than 60% of amino acid sequence identity with MrgA from *Synechocystis*.

Haem biosynthesis becomes one of the most important routes of iron utilization in both prokaryotic and eukaryotic organisms. In cyanobacteria, there is a continuous requirement for haem synthesis to supply respiratory cytochromes and other relevant haem-proteins (Ogola *et al.*, 2009; Sturms *et al.*, 2011), but also as intermediate in the synthesis of other

essential tetrapyrroles, the light-harvesting photosynthetic accessory pigments phycobilins (Beale, 1994). Cyanobacteria produce four classes of tetrapyrroles (chlorophyll, haem, sirohaem and phycobilins) via a common branched pathway. Tetrapyrroles biosynthesis must be tightly regulated since different amounts of each tetrapyrrole end product are required by cells; but in addition, all the tetrapyrrole intermediates are phototoxic and generate ROS when they are excited by light. Post-transcriptional modulation of enzyme activities contributes to a quite fine-tuned adaptation of tetrapyrrole biosynthesis to environmental conditions (Czarnecki & Grimm, 2012). However, the control of enzyme abundance at the level of gene expression have been also extensively demonstrated (Aoki *et al.*, 2012; Qi & O'Brian, 2002; Zappa *et al.*, 2010). In the present study we provide strong evidence that FurA modulates the expression of at least five genes coding for enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis, mediating at early stages by controlling porphobilinogen synthase (*hemB*) and porphobilinogen deaminase (*hemC*) levels, but also at the final steps of haem biosynthesis branch, controlling the expression of protoporphyrinogen oxidase (*hemK*) and ferrochelatase (*hemH*). In addition, FurA appears to regulate the haem-degrading enzyme haem-oxygenase 1 (*hox1*), the first step of the phycobilin synthesis branch.

Connection between cellular iron levels and tetrapyrrole biosynthesis has been previously recognized. The Fur family transcriptional regulator Irr negatively modulates the pathway at *hemB* in *Bradyrhizobium japonicum* under iron limitation, sensing the iron through the status of haem by a mechanism of direct interaction with ferrochelatase (Chauhan *et al.*, 1997; Qi & O'Brian, 2002). Curiously, iron deprivation usually results in down-regulation of iron-consuming metabolic pathways in non-phototrophic organisms, including haem biosynthesis (Schobert & Jahn, 2002), a reasonable response to avoid deleterious accumulation of protoporphyrin IX, the immediate precursor of haem. By contrast, iron

deprivation leads to induction of porphyrin biosynthesis in plants (Duggan & Gassman, 1974), a similar phenotype to that observed in *Anabaena* sp. under our experimental conditions. Since haem constitutes an intermediate in the synthesis of other essential tetrapyrroles in plants and cyanobacteria (phytychromobilin and phycobilins), it is likely that increased haem degradation under iron limitation conditions as endogenous source of iron exerts a positive feedback on its own synthesis.

Interestingly, our results suggest a dual role of FurA on the transcription of tetrapyrrole biosynthesis genes, repressing transcription of *hemB*, *hemC* and *hoI*, but activating at the same time the expression of *hemK* and *hemH*. This dual regulatory role on the tetrapyrrole biosynthesis pathway have been previously observed in at least four transcriptional regulators, CrtJ, FnrL, AerR and HbrL, in the facultative photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* (Zappa *et al.*, 2010), and seems to facilitate adjustment between early and late steps of tetrapyrrole biosynthesis to ensure, in addition to post-translational controls, the balanced metabolic flux in the pathway by proper modulation of enzyme abundance.

FurA binds haem in the micromolar range of concentration, inhibiting its *in vitro* DNA binding ability in a concentration-dependent manner (Hernández *et al.*, 2004b). The physicochemical features of the haem binding to FurA suggest a putative role of this transcriptional regulator as a haem sensor protein, which use haem as a signalling molecule (Pellicer *et al.*, 2012). The physiological meaning of the FurA-haem interaction remains undetermined. However, accordingly to the results presented here, it is reasonable to suggest that haem levels could directly modulate by feedback and feedforward mechanisms the transcription of FurA-mediated genes coding for some of haem metabolism enzymes. Hence, the synthesis of haem from protoporphyrin IX by ferrochelatase (FC) or its degradation by haem oxygenase I (HO-1) would be

feedback/feedforward controlled by haem at level of enzyme synthesis via FurA. The verification of this hypothesis awaits further studies.

Sequence alignments of entire FurA target promoter regions have usually revealed minimal homology. Previous attempts to define a functional FurA box sequence into the *furA* promoter have failed, since a short synthetic DNA sequence containing the putative iron boxes only displayed quite feeble binding of the metalloregulator (González *et al.*, 2011). Thus, a proper DNA conformation into an A/T-rich operator region appeared to be essential for an efficient recognition and high affinity binding, rather than a conserved iron box sequence. In the present work we have defined a putative FurA regulatory consensus sequence, which was deduced from a well-conserved 23 bp region observed in eight FurA footprinted binding sites from six iron-responsive FurA targets. The *in silico* analysis of this putative regulatory consensus supports the hypothesis that cyanobacterial FurA, as occurs with Fur from heterotrophic bacteria (Baichoo & Helmann, 2002; Lavrrar & McIntosh, 2003), interacts with DNA as a dimeric protein recognizing arrays of conserved motifs. The presence of at least three 8-mer motifs in the consensus sequence, as well as the extension of the FurA protected regions in footprinting assays are consistent with the idea that more than one dimer of FurA binds to the operator for transcriptional regulation.

In summary, the results presented here demonstrated the role of FurA as the master regulator of iron homeostasis in *Anabaena* sp. PCC 7120, modulating the expression of genes involved in every step of iron homeostasis. Comparative gene expression analyses under different iron availability conditions and FurA expression levels, in combination with *in vitro* binding experiments, led to define a variety of novel direct iron-dependent transcriptional targets of this metalloregulator in *Anabaena* sp. PCC 7120, including genes encoding at least five enzymes involved in tetrapyrrole biosynthesis. To our best knowledge, this is the first evidence of Fur proteins, different of the Irr homologue of

rhizobia, controlling the expression of tetrapyrrole biosynthesis enzymes in response to iron availability.

CAPÍTULO 4

FurA participa en la diferenciación a heterocistos

González A, Valladares A, Bes T, Peleato ML, Fillat MF.
FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120.
Plant and Cell Physiology (In revision).

4.1 ABSTRACT

In the filamentous nitrogen-fixing, heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, FurA is a global transcriptional regulator that controls iron homeostasis, but also modulates the expression of a variety of genes involved in different functions. After nitrogen deprivation, expression of *furA* is strongly induced by NtcA in proheterocyst and remains stably expressed in mature heterocyst. In the present study, we provide evidence that overexpression of *furA* in *Anabaena* sp. partially suppressed heterocyst differentiation by impairing morphogenesis at an early stage. After nitrogen step-down, the *furA*-overexpressing strain exhibited a phenotype of semiregularly spaced early proheterocysts that showed loss of phycobiliproteins and no deposition of heterocyst-specific polysaccharide layer in the cell envelope. Recombinant purified FurA specifically bound *in vitro* to the promoter regions of *ntcA* and *hetR*, but not to those of other key players involved in early and middle steps of heterocyst differentiation. Quantitative RT-PCR analyses indicated that *furA* overexpression blocks heterocyst differentiation at a step later than *hetR* induction, affecting the transient increase of *ntcA* expression that occurs shortly after nitrogen step-down. Overall, the findings suggest that *furA* is developmentally regulated by NtcA during heterocyst differentiation, and its proper expression at each time appears to be required for normal heterocyst development.

4.2 INTRODUCTION

Biological nitrogen fixation is performed by certain cyanobacteria in environments where inorganic nitrogen species (i.e., ammonium, urea, nitrate, nitrite) become depleted. Since the nitrogen-fixing enzyme nitrogenase is irreversibly inactivated when exposed to molecular oxygen, some filamentous diazotrophic cyanobacteria spatially separate photosynthesis and nitrogen fixation by differentiating highly specialized cells called

heterocyst (Flores & Herrero, 2010; Kumar *et al.*, 2010). Heterocysts deposit glycolipid and polysaccharide layers outside of their cell wall to limit the entry of atmospheric oxygen, but also lack photosystem II activity and increase respiration rate to consume O₂ that enters the cell, providing thereby a microoxic compartment for the expression of the oxygen-sensitive nitrogenase. In the filamentous heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, about 7 to 12% of the vegetative cells terminally differentiate into nitrogen-fixing heterocysts when grow in the absence of combined nitrogen. Single heterocysts are spaced at semiregular intervals of 10 to 15 vegetative cells along a filament composed of tens or even hundreds of individual cells, each surrounded by its own plasma membrane and a peptidoglycan layer, but sharing a continuous periplasm enclosed by a common outer membrane (Mariscal *et al.*, 2007; Wilk *et al.*, 2011). Heterocysts provide fixed nitrogen as amino acids to the neighbouring vegetative cells, while vegetative cells supply heterocysts with fixed carbon produced by photosynthesis, thus creating a multicellular microorganism with two mutually dependent cell types (Flores & Herrero, 2010).

Heterocyst development and its pattern formation are consequences of multiple external and internal signals, the action of several positive and negative regulators, the communication between the cells of the filament, and the spatial/temporal regulation of gene expression and cellular processes (Flaherty *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Differentiation process begins shortly after nitrogen deprivation (Muro-Pastor *et al.*, 2002), triggered by the CAP family transcriptional regulator NtcA, the global regulator of nitrogen metabolism (Herrero *et al.*, 2001). NtcA senses the accumulation of 2-oxoglutarate (2-OG) resulting from nitrogen limiting conditions and activates the expression of NrrA (Ehira & Ohmori, 2006a; Valladares *et al.*, 2008), a nitrogen-responsive response regulator that upregulates the expression of HetR, the master regulator

of heterocyst differentiation (Buikema & Haselkorn, 1991). In a mutually dependent expression, the induction of *hetR* transcription produces a transient increase of NtcA levels in a HetR-dependent manner (Muro-Pastor *et al.*, 2002), and this mutual up-regulation under a nitrogen deficiency status appears essential for the subsequent induction of other heterocyst development genes (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Acting downstream to HetR induction, other players in the regulatory cascade have been identified, including PatS (Wu *et al.*, 2004) and HetN (Callahan & Buikema, 2001), which respectively govern *de novo* pattern formation and pattern maintenance by suppressing the differentiation of vegetative cells near to proheterocyst and mature heterocyst, while expression of *hanA* (Khudyakov & Wolk, 1996), *hetC* (Khudyakov & Wolk, 1997), *devBCA* (Fiedler *et al.*, 1998) or *devH* (Hebbar & Curtis, 2000), among others genes (Flores & Herrero, 2010; Herrero *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010) is essential for early stages of differentiation and maturation of heterocysts.

In nature, biological nitrogen fixation is also influenced by iron bioavailability (Kustka *et al.*, 2002; Sohm *et al.*, 2011). Iron is one of the most important potentially limiting nutrient metal for photoautotrophic growth in diverse environments, from the open ocean to coastal regions and lakes (Morel & Price, 2003; Wilhelm, 1995). Diazotrophy imposes additional iron demands for growth beyond those attributed to photosynthesis and respiration, since nitrogenase contains up to 36 iron atoms per enzyme complex, in addition to the iron-containing proteins required to supply sufficient reductant for nitrogen fixation. To maintain viability under iron plus nitrogen limitation, the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101 selectively sacrifices nitrogen fixation to conserve iron for photosynthetic and respiratory electron transport (Kupper *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2007), while nitrogen fixation and heterocyst differentiation are severely impaired in *Anabaena*

sp. PCC 7120 grown under iron deficiency (Narayan *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2006; Wen-Liang *et al.*, 2003).

In previous studies using *in vitro* and *in silico* analyses we have identified a variety of potentially overlapping transcriptional targets of NtcA and the essential ferric uptake regulator FurA (López-Gomollón *et al.*, 2007a). In addition, *furA* appeared up-regulated after nitrogen deprivation specifically in proheterocyst and mature heterocysts, and this induction depended on NtcA, as it did not occur under a *ntcA* mutant background (López-Gomollón *et al.*, 2007b).

As the master regulator of iron homeostasis and sensor of iron availability, FurA could have a critical role in modulation of heterocyst differentiation. In the present study, we present evidence that FurA influences heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC 7120 by controlling the expression of NtcA.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Strains and growth conditions

The heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 and its *furA*-overexpressing derivative strain AG2770FurA (González *et al.*, 2010) were grown photoautotrophically at 30°C in BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979) or BG-11₀ (BG-11 without NaNO₃) under continuous illumination with white light at 75 μE m⁻²s⁻¹. All cultures were supplemented with 0.84 g of NaHCO₃ liter⁻¹ and bubbled with a mixture of CO₂ and air (1% v/v). For strain AG2770FurA, cultures were supplemented with 50 μg neomycin ml⁻¹. Chlorophyll *a* (Chl) was determined in methanol extracts (Nicolaisen *et al.*, 2008).

For heterocyst induction, exponentially growing filaments (3 μg Chl ml⁻¹) from standard BG-11 were collected by filtration, washed twice with BG-11₀ and resuspended in the

same nitrogen-free medium. Cultures were further incubated for 72 h and filaments were scored for heterocyst frequency at 24 h time intervals.

For RNA isolation, samples of 100 ml from cultures in BG-11₀ were collected for the number of hours indicated in the experiment. Filaments were harvested at room temperature and immediately frozen in liquid nitrogen to RNA isolation.

4.3.2 Heterocyst frequency, pattern spacing and microscopy

Filaments were treated with 0.05% alcian blue (Sigma) for 5 min to stain heterocysts. Heterocyst frequency was referred as the percentage of heterocysts in the total cyanobacterial cell population, and determined by counts of more than 1000 cyanobacterial cells per sample.

Pattern spacing was referred as the mean distance between differentiating cells, measured as the number of intervening vegetative cells, averaging 20 intervals per sample.

Photomicrographs were taken under a $\times 40$ dry objective on an Olympus BX60 microscope equipped with a DFC300 FX Leica digital camera.

4.3.3 Acetylene reduction assay

Nitrogenase activity was determined by the acetylene reduction assay at 24, 48 and 72 h after nitrogen step-down. Samples of 2 ml containing $10 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ in BG11₀ were incubated under atmosphere of 14% acetylene in air, with shaking and standard illumination at 30°C. Production of ethylene was determined by gas chromatography in samples taken after 0, 30 and 60 min of incubation.

4.3.4 Electrophoretic mobility shift assays

Recombinant *Anabaena* sp. FurA protein was produced in *E. coli* BL21(DE3) using the expression vector pET28a (EMD Biosciences), and purified according to previously described methods (Hernández *et al.*, 2002). The promoter regions of each gene of interest were obtained by PCR using the primers listed in Table 4.1. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as described previously (Hernández *et al.*, 2006a). Briefly, 100-120 ng of each DNA fragment were mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300, 500 and 700 nM in a 20 µl reaction volume containing 10 mM bis-Tris (pH 7.5), 40 mM potassium chloride, 0.1 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 1 mM DTT, 100 µM manganese chloride, and 5% glycerol. In some experiments, EDTA was added to a final concentration of 200 µM. To insure the specificity of EMSA, the promoter region of *Anabaena* sp. *nifJ* (*alr1911*) gene was included as non-specific competitor DNA in all assays. In addition, the promoter region of *furA* was included as positive control (González *et al.*, 2010). Mixtures were incubated at room temperature for 30 min, and subsequently separate on 4% non-denaturing polyacrylamide gels in running buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine) at 90 V. Gels were stained with SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) and processed with a Gel Doc 2000 Image Analyzer (Bio-Rad).

4.3.5 DNase I footprinting analysis

DNase I protection assays were performed as previously described (Valladares *et al.*, 2008), with slight modifications. Briefly, protein-DNA complexes were formed in a final volume of 15 µl reaction buffer containing 10 mM bis-Tris (pH 7.5), 40 mM KCl, 100 µM MnCl₂, 1 mM DTT, 0.07 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 0.07 mg ml⁻¹ poly(dI-dC)], 5% glycerol with 10 fmol of ³²P-end-labelled (with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP) DNA fragment, 1 mM ATP, and the reconstituted RNAP holoenzyme. The reaction

mixtures were incubated for 30 min at 30°C. Then, 1 U DNase I (Roche) was added in a buffer containing 50 mM sodium acetate and 6 mM MgSO₄, and the reaction was incubated for 10-15 s at 37°C, and immediately stopped with 4 µl of stop solution [0.5 mM EDTA, 0.125% SDS, 12.5 mM ammonium acetate (pH 5.2)]. The products were resolved in 6% polyacrylamide with 4.68 M urea gels next to the corresponding sequencing ladder. Radioactive bands were visualized with a Cyclone Plus Storage Phosphor System and OptiQuant image analysis software (PerkinElmer).

4.3.6 Real-time PCR

Total RNA was isolated according to previously described procedure (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Samples of 1 µg RNA were heated at 85°C for 10 min and used as template for the first strand cDNA synthesis. Residual DNA in RNA preparations was eliminated by digestion with RNase-free DNase I (Roche). The absence of DNA was checked by PCR. Reverse transcription was carried out using SuperScript retrotranscriptase (Invitrogen) in a 20 µl reaction volume containing 150 ng of random primers (Invitrogen), 1 mM dNTP mix (GE Healthcare) and 10 mM DTT. Real-time PCR (qRT-PCR) was carried out using a LightCycler[®] 2.0 system (Roche). Reactions were set up in glass capillaries in a final volume of 10 µl containing 2 µl LightCycler[®] FastStart Master^{PLUS} SYBR Green I Reaction mix-enzyme (Roche), 1.25 pmol of each primer and 0.75 ng cDNA. Negative controls with no cDNA were included. All reactions were performed with three different biological samples. The sequences of specific primers used for transcript quantification of selected genes are defined in Table 4.1. All primers were tested functionally in quantitative analysis and the results were optimal. Melting curve analysis showed that there was no primer dimer formation. The housekeeping gene *rnpB* (Vioque, 1992) was used as a

reference for relative quantification of selected transcripts. Relative quantification was performed according to the Pfaffl method (Pfaffl, 2001).

Table 4.1. Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
PfurA_up	CTCGCCTAGCAATTTAACAAC	EMSA
PfurA_dw	GCCTTGAGCGAAGTATTTGTC	EMSA
PnifJ_up	GCCTACTCTGCGAGTTCTCCG	EMSA
PnifJ_dw	GGCCTGTGAGAGTTGCTGCAC	EMSA
PntcA_up	CATGGTTAGCAAAAATGATG	EMSA
PntcA_dw	CTTGTGTCACGATCATCTCC	EMSA
PhetR1_up	GGGAAAGTCCTTGTAGGTTAC	EMSA
PhetR1_dw	CGCTTGATCAGATCGATG	EMSA
PhetR2_up	GTCTATAATTTCCCTCCAG	EMSA
PhetR2_dw	CTAATAAGTAACCTACAAG	EMSA
PhetR3_up	AACCCTTATGACAAAGGAC	EMSA
PhetR3_dw	CTGGAGGGAAAATTATAG	EMSA
PnrrA_up	GCCAAAATTAACCTCTGTG	EMSA
PnrrA_dw	CAACGATTTCAATACAAACC	EMSA
PhanA_up	GGTGATGACAAGGCTTGG	EMSA
PhanA_dw	CATTTGGAACCTCTTAATGTTTAC	EMSA
PpatS1_up	GCATATTTACGTAAAAAGTTCTATC	EMSA
PpatS1_dw	CCGGATAGTTAAATGCAAAAAG	EMSA
PpatS2_up	GCATTTAACTATCCGGATTTTTTAC	EMSA
PpatS2_dw	GCACCATTGTTATTCTTATTGACC	EMSA
PpatS3_up	GGTCAATAAGAATAACAATGGTGC	EMSA
PpatS3_dw	CATAATCTTAAAATCGGTGAATTAC	EMSA
PhetN1_up	GTTATGAGTGAGTTATCCTGG	EMSA
PhetN1_dw	CATTGTAACCTGCTAGTCTCC	EMSA
PhetN2_up	GGAGAAGACGCGATGAATCG	EMSA
PhetN2_dw	CTAGCTCATAGAACTTACGCGC	EMSA
PdevH_up	GGTTTTTATGAGGGGCTAAG	EMSA
PdevH_dw	GATGGAGATTGCATAGGTAAC	EMSA
Pasr1734-1_up	GTTGATGTGAAAAGCTTTAAAAAC	EMSA
Pasr1734-1_dw	CATAGTTTTAGAGATTCCTGTGC	EMSA

Table 4.1. Oligonucleotides used in this study (Cont.)

Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
Pasr1734-2_up	GATTTTACTTTTGATAAAAATTGCTC	EMSA
Pasr1734-2_dw	CGAAGATTGAATCTTCCTGTGTC	EMSA
PhepA1_up	CAGTATCTGTAGGGTGCCTATC	EMSA
PhepA1_dw	CTTGCTTGCTGAAATAAGTATAG	EMSA
PhepA2_up	GGGTGAATAATGCCCTG	EMSA
PhepA2_dw	CTCTTTCCAGAAGCTATTAGC	EMSA
PhepB1_up	CCCTAGAGGATGAAAATTGAAG	EMSA
PhepB1_dw	GGCATTCTCTCATGATATAGAG	EMSA
PhepB2_up	CTCTATATCATGAGAGAAATGCC	EMSA
PhepB2_dw	CTCCTAGTACTGTATGGAGCTTG	EMSA
PhepC1_up	GCCAATTAAGTTGTCATGATTAAG	EMSA
PhepC1_dw	CCTAACCTTTGTAATATCCGCC	EMSA
PhepC2_up	GGCGGATATTACAAAGGTTAG	EMSA
PhepC2_dw	CGCTTGTCATAATGTCTTTGG	EMSA
PhepK_up	CGCTGGTTATGAAGCTGG	EMSA
PhepK_dw	CCCTCAAATCTCCTTACCCTC	EMSA
qRT-rnpB_up	GGTAAGAGCGCACCAGCAGTATC	qRT-PCR
qRT-rnpB_dw	GTTCCCTTCGGCCTTGCTCCC	qRT-PCR
qRT-ntcA_up	CTGCACCAATTGAACAAGTGGAGC	qRT-PCR
qRT-ntcA_dw	GACCCCGCAGCATCAACATC	qRT-PCR
qRT-hetR_up	GGTGAAGATAACCGCTCGG	qRT-PCR
qRT-hetR_dw	CTCGCATAGCGTTTGGCCG	qRT-PCR
qRT-hepA_up	GCGATCGCTCACAGACTCTCCAC	qRT-PCR
qRT-hepA_dw	CCCTGCTCAACAATTGCCCC	qRT-PCR
qRT-hepB_up	CACTCCCATTGGAGGAATGCCAG	qRT-PCR
qRT-hepB_dw	GCAGTAGCTTCAGGAGAGGCTG	qRT-PCR
qRT-hepC_up	CATCCTCGAATCTTGCAAGTTTGG	qRT-PCR
qRT-hepC_dw	CATTTCTCCCCGCAATACATTCC	qRT-PCR
qRT-hepK_up	CAAGAATGCTGTTGTTGGAGCGC	qRT-PCR
qRT-hepK_dw	CATCGGTAAGCGCTGGGGATC	qRT-PCR
qRT-abp2_up	GTGTTGCGATCGCCAGTGTGTTG	qRT-PCR
qRT-abp2_dw	CATTGCGGCGAGCGATAACC	qRT-PCR

4.3.7 Bioinformatic tools

Primers design and sequence analysis were performed using the Vector NTI[®] software suite (Invitrogen). Percentage sequence identities were calculated using William Pearson's *lalign* program (Huang & Miller, 1991).

4.4 RESULTS

4.4.1 Overexpression of *furA* partially inhibits heterocyst differentiation

The *furA*-overexpressing strain AG2770FurA carries pAM2770FurA, which contains an extra copy of *furA* driven by the *Anabaena* sp. *petE* promoter (González *et al.*, 2010). Shuttle plasmid pAM2770 contains a pDU1 replication origin, and it is presume to be present at 17 copies per chromosome (Lee *et al.*, 2003). The cooper-inducible *petE* promoter is expressed mainly in vegetative cells but has some activity in differentiating cells (Wu *et al.*, 2004), and has been previously used as effective tool in heterocyst development studies (Buikema & Haselkorn, 2001; Liu & Golden, 2002; Yoon & Golden, 1998). Overexpression of *furA* from the *petE* promoter on a multicopy plasmid partially suppressed heterocyst development after nitrogen step-down (Fig. 4.1). Staining with alcian blue is routinely used to detect heterocyst-specific exopolysaccharides that are present in the early proheterocyst envelope (Hebbar & Curtis, 2000). The light microscopy analysis of strain AG2770FurA at 24 h after nitrogen step-down revealed a lot of filaments with a curious pattern of single cells semiregularly spaced, that began to differentiate but blocked differentiation at an early stage. Alcian blue staining was not detected in these very early proheterocyst, which showed similar size to vegetative cells but a visible loss of phycobiliproteins due to phycobilisome degradation. Proheterocysts exhibiting morphogenesis arrested at such very early stage were observed at 24, 48 and 72 h after

nitrogen step-down, indicating that overexpression of *furA* did not delay, but did inhibit differentiation.

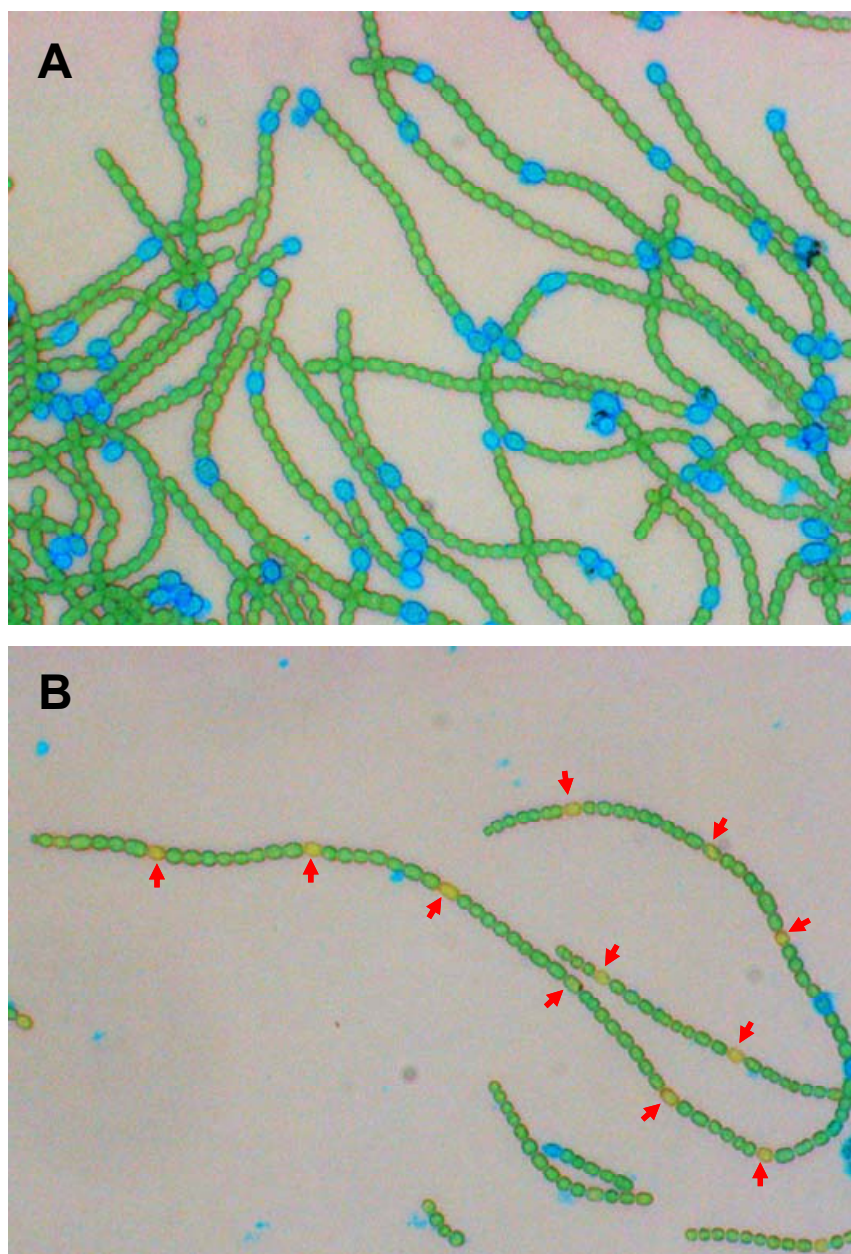


Figure 4.1. Overexpression of *furA* partially inhibits heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. Bright-field micrographs of alcian blue stained filaments of wild-type strain PCC 7120 (A) and *furA*-overexpressing strain AG2770FurA (B) grown in BG11₀ after 24 h of nitrogen step-down. Filaments showing semiregularly spaced proheterocysts with morphogenesis arrested at an early stage (indicated with red arrows) were observed in the *furA*-overexpressing strain.

Inhibition of heterocyst development under a *furA* overexpression background was only partial, since mature heterocysts also occurred in strain AG2770FurA after 24 h of nitrogen deprivation; however, heterocyst frequency was reduced more than 50% as compared to the wild-type (Table 4.2). The average spacing between differentiating cells, considering all stages of heterocyst development observed, was slightly lower in AG2770FurA than in wild-type strain at each time of analysis, which could possibly reflect lower expression of pattern controlling factors like PatS or HetN as a result of early stage morphogenesis inhibition.

Table 4.2. Diazotrophic growth parameters of *Anabaena* sp. wild-type strain PCC 7120 and *furA*-overexpressing strain AG2770FurA grown in BG-11₀ medium

Parameter	PCC 7120			AG2770FurA		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Chlorophyll <i>a</i> ^a	5.2 ± 0.3	9.4 ± 0.3	13.2 ± 0.4	3.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	6.8 ± 0.1
Heterocyst frequency ^b	12.2 ± 0.6	7.8 ± 0.4	7.3 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.3	6.3 ± 0.6
Spacing pattern ^c	11.3 ± 0.5	13.3 ± 1.0	15.8 ± 0.6	8.1 ± 0.8	8.5 ± 0.6	12.4 ± 1.2
Nitrogenase activity ^d	16.6 ± 0.5	22.4 ± 2.1	9.3 ± 0.9	7.0 ± 0.4	13.5 ± 0.5	8.2 ± 1.4

a. Values are means of three independent determinations ± SD, expressed as $\mu\text{g ml}^{-1}$.

b. Percentage of alcian blue stained proheterocyst and mature heterocysts, determined by counts of >1000 cyanobacterial cells per sample. Values are means of three independent determinations ± SD.

c. Mean distance between all differentiating cells, including proheterocyst with arrested morphogenesis, averaging the number of intervening vegetative cells in 20 intervals per sample in three independent determinations.

d. Values are means of two independent determinations ± SD, expressed as $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \mu\text{g Chl}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Nitrogenase activities of both strains were comparable, according to the heterocyst frequency registered at each time, suggesting a minor influence of *furA* overexpression on function of mature heterocysts. Partial inhibition of heterocyst differentiation did not completely impaired diazotrophic growth; however, the *furA*-overexpressing strain

displayed a lighter green colour and a lower growth rate than the wild-type in BG-11₀, maybe as sign of nitrogen limitation.

4.4.2 FurA specifically binds *in vitro* to *ntcA* and *hetR* promoters

Because the *furA*-overexpressing strain was defective for heterocyst development, we investigated the ability of recombinant FurA to bind *in vitro* the promoter region of several key players involved in early and middle stages of differentiation process (Kumar *et al.*, 2010), including *ntcA*, *hetR*, *nrrA*, *hanA*, *patS*, *hetN*, *devH* and *asr1734*, as well as some heterocyst envelope polysaccharide (hep) synthesis genes like *hepA*, *hepB*, *hepC* and *hepK*. To confirm the specificity of EMSAs, all assays included the promoter region of the *Anabaena* sp. *nifJ* gene as non-specific competitor DNA, while binding of FurA to the promoter region of its own gene was used as a positive control (González *et al.*, 2010). All gene promoters used in the analyses consisted of a 300-500 bp DNA fragment upstream the translational start point. In case of large promoters, the entire promoter region was analyzed as several fragments of 300-400 bp in independent experiments. Different binding conditions were tested for each gene, including the addition or absence of metal ion co-repressor (Mn^{2+}) and/or reducing conditions (DTT).

Among all genes analyzed by EMSAs, only *ntcA* and *hetR* showed a clear binding of FurA to their promoter regions (Fig. 4.2). None of the other analyzed players on heterocyst development showed specific binding to FurA *in vitro* according to EMSA (data not shown). In the case of *hetR*, the entire 949 bp promoter had been divided for analysis in three regions, denoted as P₁, P₂ and P₃, in order of proximity to the translational start point (ATG). As observed in Fig. 4.2, *in vitro* binding of FurA to *hetR* promoter occurred in two quite separated regions, the proximal P₁ (from position -298 to ATG), and the more distal P₃ (from position -949 to -629). The central region of *hetR* promoter, P₂ (from position

-649 to -271) did not show specific binding to FurA. As other so far recognized FurA targets, the specific binding to *ntcA* and *hetR* promoters was strongly dependent on the presence of divalent metal ions and reducing conditions.

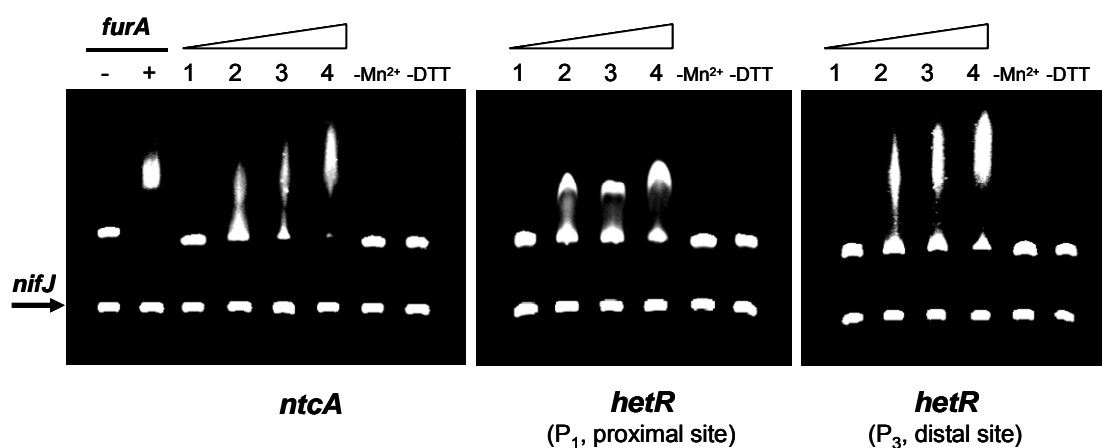


Figure 4.2. Electrophoretic mobility shift assays showing the ability of FurA to bind *in vitro* the promoter regions of *ntcA* and *hetR* genes. DNA fragments free (1) or mixed with recombinant FurA protein at concentration of 300 nM (2), 500 nM (3) and 700 nM (4) in the presence of Mn²⁺ and DTT were separated on a 4% PAGE. The impact of the metal co-repressor (removing Mn²⁺/adding EDTA) and reducing conditions (removing DTT) on the *in vitro* affinity of FurA (700 nM) to each target are also showed. Binding of FurA (500 nM) to its own promoter was included as positive control (left). The promoter region of *nifJ* gene was used as non-specific competitor DNA in all assays.

In order to determine the FurA-binding sites within the *ntcA* and *hetR* promoters, DNase I protection footprinting assays were carried out with purified recombinant FurA using binding conditions similar to those employed in the EMSA experiments (Fig. 4.3). A large binding region of 105 nucleotides (nt) was protected within the *ntcA* promoter, where binding of FurA clearly modified the pattern of DNase I digestion at every FurA concentration tested. The area protected by FurA spans from position -239 to -135 with respect to the translational start point of *ntcA*, covering the positions corresponding to the transcriptional

start point (tsp) -136 and tsp -180 (Muro-Pastor *et al.*, 2002), spaced 85 nt upstream the tsp -49 (Fig. 4.3B). In the case of *hetR*, the binding of FurA to DNA also produced modifications in DNase I digestion pattern at two binding sites, corresponding to the proximal P₁ and distal P₃ promoter regions. The protected area around the proximal binding site in P₁ promoter region spans from position -102 to -162, just 21 nt downstream from tsp -184 (Muro-Pastor *et al.*, 2002), while in the distal P₃ region the protected area included tsp -696, spanning from position -722 to -659, just 5 nt downstream tsp -728 (Fig. 4.3C).

A putative FurA regulatory consensus sequence (TGATAAAAATTCTCAATAAATAA) has been recently defined from *in silico* analyses of footprinted binding sites of several iron-responsive FurA targets (González *et al.*, In press). Scrutiny of the FurA protected areas in the *ntcA* and *hetR* promoters for the FurA regulatory consensus revealed potential FurA boxes showing 57 to 61% identity to the putative regulatory consensus (Fig. 4.3B and 4.3C). The extension of the FurA protected regions in footprinting assays is consistent with the hypothesis that more than one dimer of Fur binds to the operator for transcriptional regulation. The protein polymerized along the operator region, recognizing also adjacent binding sites with minor degrees of similarity to the consensus regulatory sequence (Escolar *et al.*, 1999).

4.4.3 FurA influences heterocyst differentiation by controlling the expression of NtcA

The affinity of recombinant FurA for the *ntcA* and *hetR* promoters, as well as the *in vivo* evidences showing that the *furA*-overexpressing strain appeared affected in heterocyst development at an early stage, led us to investigate the impact of *furA* overexpression on the transcription levels of *ntcA* and *hetR* in response to nitrogen deprivation.

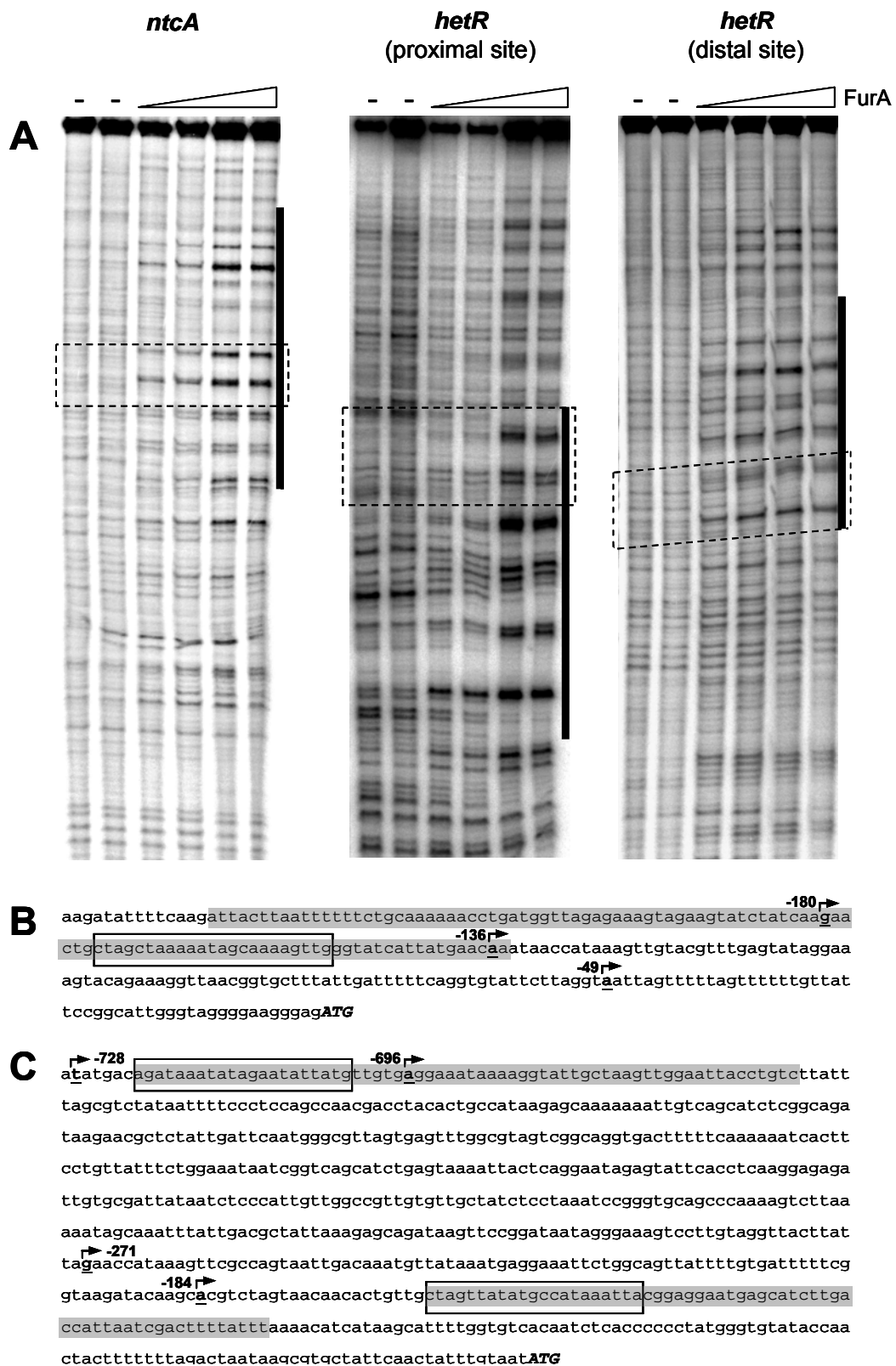


Figure 4.3. Sequences of the *ntcA* and *hetR* promoter regions protected by FurA. (A) DNase I protection footprint assays were carried out with 5 fmol of ³²P-end-labelled 300-400 bp DNA fragment and 100, 200, 300 and 500 nM of purified recombinant FurA in the presence of 100 μM MnCl₂ and 1 mM DTT. Windows

of protection due to FurA binding to *ntcA* promoter (left), as well as to proximal (central) and to distal (right) regions of *hetR* promoter are indicated by thick vertical lines. The regions enclosed by dashed lines indicated the position of sequences corresponding to putative FurA boxes, according to in silico analyses. (B) Sequence of the *ntcA* promoter, from position -253 to the translational start point. Protected area from DNase I digestion corresponding to the FurA binding site is shaded. Position of the putative FurA box is indicated by an open box. The positions and directions of the transcriptional start points (tsp) are indicated by arrows. (C) Sequence of the *hetR* promoter, from position -729 to the translational start point. Protected areas from DNase I digestion corresponding to the FurA binding sites (proximal and distal, in relation to *ATG*) are shaded. Position of the putative FurA boxes is indicated by open boxes. The positions and directions of the transcriptional start points (tsp) are indicated by arrows.

Quantitative real-time PCR analysis showed that previously to nitrogen deprivation, the expression level of all genes analyzed was low and comparable in both strains, though slightly lower in the *furA* overexpressing strain (Table 4.S1). Although the time-course of *ntcA* induction took place in a similar way in both strains, overexpression of *furA* led to a strong decrease in the number of *ntcA* transcripts compared to wild-type strain (Fig. 4.4A). Thus, the abundance of *ntcA* transcripts in both strains showed a peak of expression around 8 hours of nitrogen deprivation. However, *ntcA* transcript levels at this time were 1.8-fold lower in the *furA*-overexpressing strain. The transient induction of *ntcA* under a *furA* overexpression background rapidly decreased. At 11 hours after nitrogen step-down, the levels of *ntcA* transcripts in the strain AG2770FurA were almost 3-fold lower than those observed in the wild-type strain. By contrast, the influence of FurA on *hetR* transcription was obviously slighter. Under our experimental conditions, the induction of *hetR* expression after nitrogen deprivation in both strains was similar in time-course and magnitude (Fig. 4.4A).

Table 4.S1. Relative mRNA expression level of target genes with respect to the housekeeping gene *rnpB* before nitrogen deprivation, as determined by qRT-PCR

Gene	PCC 7120 (WT)	AG2770FurA (FurA+)
<i>ntcA</i>	2.24E-04 ± 5.66E-06	2.05E-04 ± 8.49E-06
<i>hetR</i>	4.55E-03 ± 4.95E-05	4.46E-03 ± 4.24E-05
<i>abp2</i>	1.22E-03 ± 4.24E-05	1.04E-03 ± 1.13E-04
<i>hepA</i>	7.41E-05 ± 6.36E-07	5.50E-05 ± 1.56E-06
<i>hepB</i>	6.17E-03 ± 9.90E-05	4.91E-03 ± 8.49E-05
<i>hepC</i>	1.55E-06 ± 1.13E-07	1.00E-06 ± 1.21E-07
<i>hepK</i>	9.83E-04 ± 8.49E-06	7.30E-04 ± 1.52E-05

Previous comparative proteomic analysis of the *furA*-overexpressing strain AG2770FurA showed a significant decrease in the expression of the FurA target gene *abp1* (González *et al.*, 2011), coding for a DNA binding protein involved in the regulation of the expression of heterocysts envelope polysaccharide (Hep) genes (Koksharova & Wolk, 2002b). The *in vivo* evidences that heterocyst differentiation appeared to be arrested at early stages under a *furA* overexpression background, together with the apparent failure of this strain in the synthesis of heterocyst envelope polysaccharide, led us to analyse the expression of five different genes directly involved in exopolysaccharide deposition, including *hepA*, *hepB*, *hepC*, *hepK* and *abp2* (Huang *et al.*, 2005; Koksharova & Wolk, 2002b; Wang *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 1998). As shown in Fig. 4.4B, the expression of all these genes appeared markedly down-regulated in the *furA*-overexpressing strain compared to the wild-type.

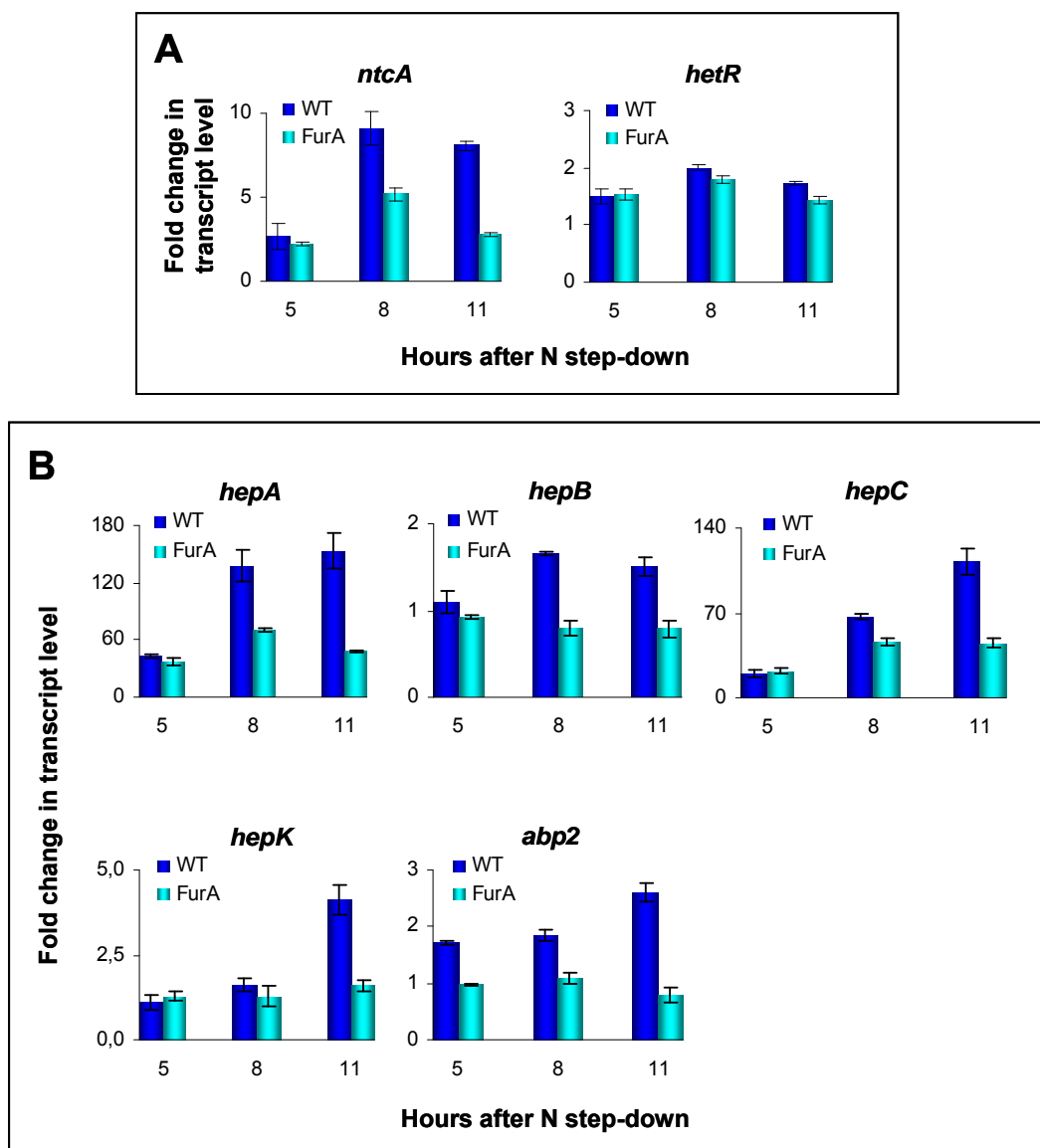


Figure 4.4. Change in transcript level of selected genes in *Anabaena* sp. PCC 7120 (WT) and the *furA*-overexpressing strain AG2770FurA (FurA) after nitrogen step-down, as revealed by qRT-PCR analysis. (A) Fold induction of FurA target genes *ntcA* and *hetR* in the early stage of heterocyst development. (B) Fold changes in mRNA abundance of several heterocyst envelope polysaccharide synthesis genes. RNA was isolated from ammonium-grown cells subjected to nitrogen deficiency for the number of hours indicated in each case. Expression levels at each time were calculated relative to that observed in control samples at the beginning of the experiment and normalized using endogenous housekeeping gene *rnpB*. Bars indicated the means of three independent determinations \pm SD.

4.5 DISCUSSION

Iron availability is critically important in the regulation of cyanobacterial diazotrophic growth, from heterocyst differentiation to nitrogenase activity (Kupper *et al.*, 2008; Narayan *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2006; Wen-Liang *et al.*, 2003). The results of the present study indicate that FurA, the master regulator of iron homeostasis in *Anabaena* sp. PCC 7120, is directly involved in regulation of heterocyst development by controlling the expression of NtcA.

Previous works performed in our laboratory have shown that expression of *furA* is activated by NtcA and strongly induced in proheterocyst during the first 15 h after nitrogen step-down, to remain stably expressed in mature heterocyst (López-Gomollón *et al.*, 2007b). The identification of common elements overlapping the NtcA and FurA regulons additionally suggested a cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks (López-Gomollón *et al.*, 2007a). Since *furA* seems to be essential for *Anabaena* sp. under standard culture conditions (Hernández *et al.*, 2006b), we used a FurA overexpressing strain to better understand the role of this regulator in heterocyst development. Despite the overexpression of a global transcriptional regulator like FurA could result in an aberrant phenotype as consequence of pleiotropic effects not directly related to the normal function of the protein, the overexpression approach led us to identify novel direct targets of this apparently essential transcriptional regulator by combining the analysis of phenotypic changes with both transcriptional profile variations and FurA-DNA interactions (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011). Thus, although FurA overexpression led to a wide range of phenotypic and transcriptional changes in *Anabaena* sp. under standard culture conditions, the results of *in vitro* binding analysis made it possible to discern direct transcriptional FurA targets such as genes encoding a siderophore outer membrane

transporter (*schT*), bacterial actins (*mreBCD*), or the photosystem II reaction center protein D1 (*psbA*) (González *et al.*, 2010).

Our results show that overexpression of *furA* partially inhibits heterocyst differentiation at an early stage, resulting in abundant filaments exhibiting semiregularly spaced early proheterocyst with arrested morphogenesis and no deposition of the envelope exopolysaccharide layer. The heterocyst envelope polysaccharide (HEP) is absolutely necessary to the establishment of a micro-oxic intracellular milieu for protection of the O₂-labile nitrogenase. The absence of HEP led to a Fox⁻ phenotype (Ernst *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2005), unabling the cyanobacterium to fix dinitrogen in the presence of oxygen. Genes required for the formation of HEP have been denoted as Fox genes and includes *hepA*, *hepB*, *hepC*, *hepK*, among several others. Notably, an appreciable decrease in transcription of several Fox genes occurred under a FurA overexpression background, which could explain the fails in the synthesis of HEP observed in several filaments of the strain AG2770FurA. However, only *abp2*, which appear to constitute an operon with *abp1* (Koksharova & Wolk, 2002b), is presumably a FurA transcriptional target according to differential proteomics and *in vitro* binding assays (González *et al.*, 2011). None of the other *hep* genes analysed showed specific binding of recombinant FurA according to EMSA experiments (data not shown). Since *abp1* and *abp2* mutants are able to synthesize HEP (Koksharova & Wolk, 2002b), a FurA modulation of these genes did not solely explain the *in vivo* evidences of morphogenesis arrest. Hence, down-regulation of *hep* genes could be a pleiotropic effect of FurA overexpression or an indirect consequence of FurA modulation on the expression of other regulatory genes involved in heterocyst differentiation.

Quantitative RT-PCR analyses indicated that *furA* overexpression appears to block heterocyst differentiation strongly affecting the transient increase of the *ntcA* transcription

level that normally takes place after nitrogen deprivation as a result of the mutual dependence of NtcA and HetR (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Although the precise time course of the induction of NtcA depends on the experimental conditions, the maximum increase observed in this work at 8-11 hours of nitrogen step-down in *Anabaena* WT is consistent with previously reported data (Muro-Pastor *et al.*, 2002). In contrast, the induction of *ntcA* is clearly impaired and less persistent in the AG2770FurA strain, whose transcription level at 11 hours is around 32% of the value reached in the WT strain. Because *furA* is upregulated by NtcA in proheterocyst (López-Gomollón *et al.*, 2007b) and its overexpression appears to down-regulate *ntcA* expression, it is reasonable to speculate that FurA may function regulating the timing of NtcA induction, acting presumably in conjunction with other regulators as an NtcA shutoff switch during the middle to late stages of differentiation, in a similar role to PknE on HetR (Saha & Golden, 2011). Although the potential regulatory role of FurA on *hetR* expression was not so evident regarding the *in vivo* assays (Figure 4.4A), the slight transcriptional change of *hetR* observed under a *furA* overexpression background was in the range of those observed in the expression of other direct FurA targets such as porphobilinogen deaminase and haem-oxygenase 1 (González *et al.*, In press). In addition, it cannot be ruled out that the potential effect of FurA on *hetR* expression might be more obvious under growth conditions different to those simulated in our experiments, since FurA specifically bound *in vitro* to promoter regions of *ntcA* and *hetR*, but not to those of other several key players involved in early and middle differentiation stages. Binding of recombinant FurA protected a wide region into *ntcA* promoter, as well as two distant regions into *hetR* promoter as revealed by DNase I protection assays. Potential FurA boxes sharing high sequence identity to the putative FurA regulatory consensus were identified into the FurA protected regions of both promoters. Thus, according to the *in vitro* binding analyses, FurA could modulate

heterocyst differentiation in two major points at the regulatory cascade, by controlling the expression of the global regulator of nitrogen metabolism NtcA, but also modulating the expression of the master regulator of heterocyst differentiation HetR. Consistently with this hypothesis, the FurA-protected HetR-inducible *tsp* -180 of *ntcA* appears to be transiently used during early heterocyst development, but not in mature heterocysts, while the other nitrogen-responsive *tsp* -49, which apparently escapes to the control of FurA, remains active in mature heterocysts (Herrero *et al.*, 2004). Taking into account that FurA is present at basal levels in all vegetative cells, its function as *ntcA* transcriptional repressor may rely on its concentration rather than solely its normal expression. Thus, the *furA* gene is developmentally regulated by NtcA during heterocyst differentiation, and its proper expression at each time appears to be required for normal heterocyst development.

As occurs with all so far previously identified FurA direct targets (González *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2006a), the affinity of this regulator to *ntcA* and *hetR* promoters was markedly affected by the absence of divalent metal ions and reducing conditions, suggesting a critical role of the metal co-repressor and redox status to FurA function *in vivo*. However, a certain iron limitation exerts different effects on each Fur regulon component, even on those directly repressed by the regulator (Bjarnason *et al.*, 2003). Consequently, a group of targets, usually those involved in iron homeostasis and oxidative stress defences, are most susceptible to iron deficiency than other direct targets which could even remain repressed under signals of iron deficiency. In a model of interactions (Fig. 4.5), the expression of the negatively autoregulated *furA* gene is induced as a response to iron deprivation or oxidative stress status (Hernández *et al.*, 2002; López-Gomollón *et al.*, 2009) and, under this background, *de novo* differentiation to heterocyst would result seriously affected by down-regulation of *ntcA*, a phenomenon that possibly takes place in nature with heterocyst-forming diazotrophic cyanobacteria growing under

iron-limited environment. Despite our *in vitro* analyses suggest a direct regulatory role of FurA on *hetR* expression, a repression of *hetR* transcription in the *furA*-overexpressing strain was not evident under our experimental conditions. Thus, the potential effect of FurA on *hetR* expression *in vivo* could be obvious under growth conditions different to those simulated in our experiments.

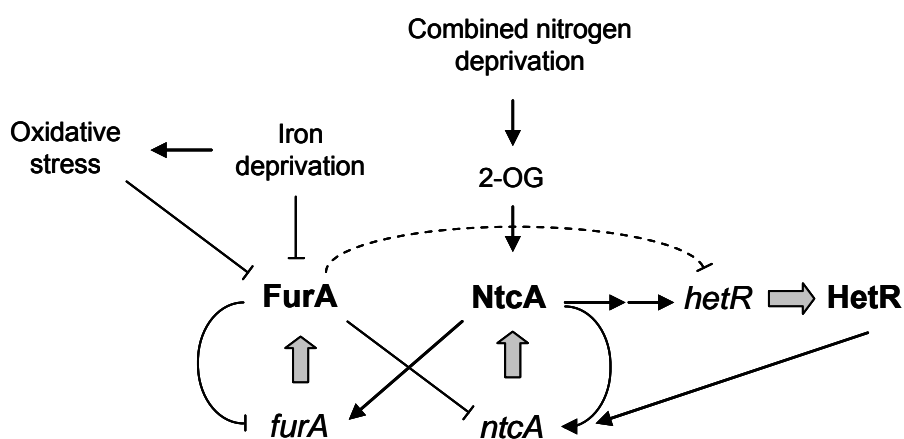


Figure 4.5. A model showing the proposed role of FurA in regulating *ntcA* expression during heterocyst development. During the early phase of differentiation, NtcA upregulates the expression of *furA* in proheterocyst. The increased levels of FurA at the middle to late stages of differentiation negatively regulates *ntcA* expression, and FurA may collaborate with other signals to regulate the timing of the transient NtcA induction that occurs shortly after nitrogen step-down. Under iron deprivation or oxidative stress growth conditions, the negatively autoregulated *furA* is induced, and *de novo* differentiation to heterocyst would result seriously affected by down-regulation of *ntcA*. Open arrows represent gene expression to the corresponding protein. Lines ending in arrows and bars indicate positive and negative interactions, respectively. Dashed arrow indicates a potential interaction between FurA and *hetR*.

Overall, our results clearly indicate that *furA* influences heterocyst differentiation by controlling, at least, the expression of *ntcA*. NtcA is essential for the initiation and early

stages of heterocyst development, but also influences heterocyst maturation and function (Herrero *et al.*, 2004), activating its own transcription, but also the transcription of *hetC* (Khudyakov & Wolk, 1997; Muro-Pastor *et al.*, 1999), *devBCA* operon (Fiedler *et al.*, 1998; Fiedler *et al.*, 2001), *cox2* and *cox3* (Valladares *et al.*, 2003), and even *nifHDK* (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). The induction of expression of most of those heterocyst development NtcA targets, including *ntcA* itself, is considered as HetR-dependent, because it only takes place after the HetR-dependent increasing of NtcA levels. Controlling this transient increase of NtcA, the ferric uptake regulator FurA becomes not only a new player into the heterocyst differentiation regulatory cascade, but also a key connection between iron homeostasis and nitrogen metabolism in cyanobacteria.

DISCUSIÓN GENERAL

Gracias a las cianobacterias, la vida en nuestro planeta existe tal y como la conocemos hoy en día. Este grupo microbiano es responsable directo de la transformación de la atmósfera primitiva en una atmósfera rica en oxígeno, proceso trascendental para la evolución de las formas vivientes actuales. Las cianobacterias establecieron además endosimbiosis con los primeros eucariotas unicelulares y dieron origen a los ancestros de las plantas. El aporte ecológico y evolutivo a la historia de nuestro planeta resulta indiscutible; sin embargo, aún en la actualidad, las cianobacterias continúan ejerciendo un papel esencial en los ciclos del carbono y el nitrógeno. Como organismos procariotas, las cianobacterias ostentan características morfológicas, fisiológicas y metabólicas únicas que las convierten en atractivos modelos de estudio para procesos tales como la fotosíntesis oxigénica, la diferenciación celular y la multicelularidad, la fijación del nitrógeno atmosférico o la defensa frente al estrés oxidativo.

Como la inmensa mayoría de las formas vivientes, las cianobacterias presentan una absoluta dependencia del hierro para el desarrollo de sus procesos fisiológicos, dada la incorporación de este metal a la estructura funcional de una gran variedad de proteínas y enzimas esenciales. La baja biodisponibilidad del hierro como micronutriente en la mayoría de los ecosistemas, unido a la inherente capacidad de este metal de catalizar la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton, ha obligado a los microorganismos aerobios a un estricto control de la homeostasis celular de este nutriente, a fin de garantizar un adecuado suministro para la ejecución de las funciones vitales siempre que la incorporación, utilización o almacenamiento del hierro no conlleve a una situación de estrés oxidativo.

La influencia del hierro sobre el crecimiento y la fisiología de las cianobacterias, así como los cambios en la expresión génica que tienen lugar en estos microorganismos como respuesta a un estrés férrico u oxidativo han sido extensamente documentados. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan estos cambios en la expresión génica y garantizan la homeostasis han sido poco estudiados. En la actualidad se conoce la existencia de ortólogos Fur en la totalidad de las especies de cianobacterias cuyos genomas han sido secuenciados (Botello-Morte *et al.*, In press). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con bacterias heterotróficas, los estudios funcionales de proteínas Fur en cianobacterias son escasos y limitados.

El análisis de la secuencia genómica de la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120 condujo a la identificación de tres marcos abiertos de lectura que contenían la secuencia H₂XHX₂CX₂C, altamente conservada en proteínas Fur, que se corresponden con las secuencias génicas *all1691*, *all2473* y *alr0957* descritas en la Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase>). La proteína FurA (gen *all1691*) comparte la mayor homología con las proteínas Fur de bacterias heterotróficas y sus niveles se incrementaban ligeramente durante la exposición del microorganismo a estrés férrico (Hernández *et al.*, 2002) u oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009). Avances previos en la definición del regulón FurA han permitido la identificación de varios genes cuyos promotores son reconocidos *in vitro* por este metalorregulador, incluyendo su propio promotor y el promotor de la flavodoxina, (Bes *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2006a), los promotores de otros análogos Fur en *Anabaena* sp. como FurB y FurC (Hernández *et al.*, 2004a), el promotor de un análogo en *Anabaena* sp. de la proteína DpsA de *Synechococcus* sp. (Hernández *et al.*, 2007), el promotor del regulador global del metabolismo del nitrógeno NtcA, así como un variado número de genes corregulados por ambos reguladores (López-Gomollón *et al.*, 2007a), entre otros.

En el presente trabajo nos propusimos avanzar en la definición del regulón FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120, como parte de los estudios encaminados a profundizar en el conocimiento del papel de las proteínas Fur en la fisiología de las cianobacterias.

La sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. como herramienta de estudio del regulón

La definición del regulón FurA suponía un reto experimental. Tradicionalmente los regulones Fur son caracterizados mediante el análisis comparativo de transcriptomas y proteomas entre mutantes de delección del gen *fur* y la estirpe silvestre parental (Gao *et al.*, 2008; Troxell *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2004). Sin embargo, de forma similar a lo observado con otros ortólogos Fur en cianobacterias, los intentos previos de obtención de un mutante de delección de *furA* conducían sólo a la segregación parcial de la mutación en el genoma poliploide. En todos los casos resultaba imposible la eliminación total de las copias silvestres del gen *furA* bajo las condiciones estándar de cultivo, lo cual sugería un posible papel esencial de este regulador para la fisiología del microorganismo, al menos bajo las condiciones de cultivo ensayadas. Este fenómeno había sido observado con anterioridad por Ghassemian y Straus tras intentar deleccionar el gen *fur* en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Ghassemian & Straus, 1996), lo cual resultaba consistente con la hipótesis de que las proteínas Fur en cianobacterias estarían implicadas en la regulación de procesos esenciales para la viabilidad del microorganismo.

A fin de superar el inconveniente práctico que supone la imposibilidad de trabajar con mutantes de delección, decidimos emplear una herramienta alternativa para el estudio del regulón FurA consistente en la sobreexpresión del metalorregulador en *Anabaena* sp. mediante la introducción de un vector lanzadera con orígenes de replicación en *E. coli* y *Anabaena* sp., que contenía una copia silvestre del gen *furA* bajo control del promotor inducible *PpetE* del gen de la plastocianina de la propia *Anabaena* sp.

La sobreexpresión de reguladores transcripcionales ha sido utilizada exitosamente como herramienta complementaria o alternativa para descifrar mecanismos de regulación e identificar dianas transcripcionales tanto en cianobacterias (Buikema & Haselkorn, 2001; Liu & Golden, 2002; Olmedo-Verd *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007) como en otras especies bacterianas (den Hengst *et al.*, 2010; Ellermeier & Slauch, 2008; Engels *et al.*, 2008; Marr *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2012). Esta aproximación resulta particularmente útil para el análisis funcional de genes esenciales, cuya delección implicaría la muerte del microorganismo (Osterberg *et al.*, 2006).

El vector lanzadera pAM2770FurA, generado a partir del vector pAM2770 (Lee *et al.*, 2003), está basado en el replicón pDU1 de cianobacterias (Wolk *et al.*, 1984), alcanzando un número aproximado de 17 copias por cromosoma. Teniendo en cuenta que *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta entre 10 y 20 cromosomas por célula, la nueva estirpe de *Anabaena* sp. obtenida, denominada AG2770FurA, podría contener entre 170 y 340 copias del vector lanzadera por célula (Lee *et al.*, 2003). Por su parte el promotor *PpetE* es un promotor fuerte e inducible por Cu^{2+} (Buikema & Haselkorn, 2001) y usualmente es inducido con la adición de 400 nM de Cu^{2+} al medio de cultivo (Lee *et al.*, 2003). Sin embargo, análisis por Western blot evidenciaron que la estirpe AG2770FurA mostraba niveles similares de sobreexpresión de FurA en medio BG11 que en medio BG11 modificado por la adición de 400 nM de Cu^{2+} (González *et al.*, 2010), sugiriendo una alta inducción de *PpetE-furA* con la concentración de Cu^{2+} normalmente presente en el medio BG11, 320 nM (Rippka *et al.*, 1979). Estudios ulteriores mediante RT-PCR semicuantitativa (sqRT-PCR) demostraron que el sistema pAM2770FurA/BG11 lograba incrementar ~32 veces el nivel de expresión de *furA* en comparación con la estirpe silvestre bajo las mismas condiciones de cultivo (González *et al.*, In press).

Resulta importante tener en cuenta que, tanto la delección como la sobreexpresión de un regulador global de la transcripción como la proteína Fur, conlleva irremediablemente a la aparición de efectos pleiotrópicos en la estirpe resultante (Staggs *et al.*, 1994). No obstante, aunque algunos de los cambios fenotípicos observados en la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA fueran consecuencia de efectos pleiotrópicos o respuestas aberrantes no directamente relacionadas con la función fisiológica normal de la proteína en la célula, la sobreexpresión del regulador se convierte en una herramienta eficaz si se logran identificar los cambios de la expresión génica que son consecuencia directa de un incremento en la actividad del regulador. En tal sentido, el análisis de los cambios fenotípicos en combinación con estudios comparativos de la expresión génica y ensayos de la afinidad *in vitro* FurA-promotor resultan de vital importancia.

FurA como regulador global de la transcripción en cianobacterias

Una vez obtenida la estirpe de sobreexpresión de FurA procedimos a analizar los cambios fenotípicos que tenían lugar en la cianobacteria como consecuencia de un incremento en el número de copias de este regulador transcripcional. Teniendo en cuenta los cambios fenotípicos observados, seguidamente analizábamos los cambios en la expresión génica que podían ser responsables del cambio fenotípico. Por último, procedíamos a identificar cuáles de los cambios observados en la expresión génica estaban directamente asociados a la regulación transcripcional de FurA.

El estudio fenotípico incluyó el análisis de posibles cambios morfológicos y fisiológicos en la cianobacteria como consecuencia de la sobreexpresión de FurA (González *et al.*, 2010), pero además el estudio de cambios moleculares a nivel del proteoma (González *et al.*, 2011).

La sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. indujo múltiples cambios fenotípicos en la cianobacteria, tanto morfológicos como fisiológicos, afectando el crecimiento, la actividad fotosintética, la morfología y ultraestructura celular y las defensas frente al estrés oxidativo, entre otras (González *et al.*, 2010). Estos cambios fenotípicos eran consecuencia de cambios en los niveles de expresión de una variedad de genes, incluyendo proteínas de los fotosistemas (PS) I y II (*psaA*, *psaB*, *psaL*, *psbA*, *psbB*, *psbZ*), peroxidasas y superóxido-dismutasas (*sodA*, *sodA*, *alr3183*, *all2375*), actinas bacterianas (*mreB* y *mreC*), proteínas de estrés férrico (*isiA*), transportadores de sideróforos (*schT*) y otros homólogos Fur (*furB*, *furC*). Los estudios ulteriores de afinidad *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel evidenciaron que de todos los genes analizados, sólo tres constituían dianas directas de FurA. Entre las nuevas dianas se encontraba el gen *psbA*, que codifica para una proteína del centro de reacción del FSII (D1) cuya expresión había sido previamente observado que respondía a la disponibilidad de hierro (Singh & Sherman, 2000), aunque no se había demostrado su regulación por Fur. Además, constituían dianas de FurA el transportador de sideróforos *schT* (Nicolaisen *et al.*, 2008) y las actinas bacterianas B y C, éstas últimas conforman un operón con una tercera actina (*mreBCD*) y juegan un papel relevante en la determinación de la morfología celular (Hu *et al.*, 2007). En todos los casos, la afinidad *in vitro* del metalorregulador por sus nuevas dianas resultaba marcadamente afectada por la ausencia de iones metálicos divalentes (Mn^{2+}) y/o condiciones reductoras (DTT), sugiriendo un papel esencial del metal correpresor y el estado redox de las cisteínas para la función de la proteína *in vivo*.

La caracterización fenotípica inicial y el estudio del perfil de expresión génica de la cepa AG2770FurA revelaron dos aspectos muy curiosos de la fisiología de esta estirpe de sobreexpresión. En primer lugar, la sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. conducía a una apreciable disminución de las actividades catalasa y superóxido-dismutasa, sin

incremento de los niveles de producción de especies reactivas del oxígeno (González *et al.*, 2010). Esta disminución en las defensas antioxidantes redujo la tolerancia inmediata del microorganismo frente a la exposición a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno exógeno, aunque los niveles de actividades enzimáticas presentes resultaban suficientes para tolerar hasta 1 mM de peróxido de hidrógeno. Los resultados observados, unidos a recientes experimentos sobre la tolerancia a estrés oxidativo de *E. coli* recombinante sobreexpresando FurA, parecen sugerir la posible implicación de FurA en otras funciones celulares, más allá de su papel como regulador transcripcional, actuando quizás como sumidero de radicales libres y agente detoxificante a través de la formación de puentes disulfuro en su estructura (Botello-Morte *et al.*, 2012).

En segundo lugar, la sobreexpresión de FurA producía un inesperado incremento en la expresión de sus genes diana en lugar de una sobrerrepresión, incluyendo genes con reconocida respuesta a la disponibilidad de hierro como *isiA* o el transportador de sideróforos *schT*. Adicionalmente, el patrón de expresión observado en las superóxido-dismutasas dependientes de Fe^{2+} (*sodB*) y Mn^{2+} (*sodA*) sugería un fenotipo de estrés férrico (Dubrac & Touati, 2000; Hassett *et al.*, 1996), se inducía la expresión de Mn-SOD mientras se reprimía la expresión de Fe-SOD. Los resultados parecían indicar que la sobreexpresión de FurA incrementaba súbitamente la capacidad de unión a iones Fe^{2+} en el citosol, produciendo una rápida disminución de las reservas de correpressor libre que ocasionaba la liberación de algunos correpresores de complejos FurA- Fe^{2+} activos unidos al DNA, permitiendo la transcripción de los genes diana. Un fenómeno similar había sido observado con anterioridad en *Saccharomyces cerevisiae* sobreexpresando ferritina bajo cultivo en medio con suficiencia de hierro (Kim *et al.*, 2007).

Como parte de la caracterización fenotípica de la estirpe de sobreexpresión se realizó además un análisis proteómico comparativo mediante electroforesis bidimensional

diferencial (2D-DIGE) de las cepas PCC 7120 (estirpe silvestre) y AG2770FurA (estirpe de sobreexpresión) crecidas en medio BG11 hasta mediados de la fase exponencial de crecimiento, bajo condiciones controladas de iluminación (luz blanca continua $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), temperatura (30°C) y agitación (120 rpm en agitador orbital). Estableciendo un valor de corte mínimo de $\pm 1,5$ veces en cuanto a diferencias en la expresión proteica (Test t de Student $p < 0,05$), el análisis proteómico permitió identificar un total de 23 manchas proteicas con expresión diferencial, de las cuales 18 fueron convenientemente caracterizadas mediante espectrometría de masas resultando en un total de 10 especies proteicas diferentes. Ulteriores análisis mediante sqRT-PCR y EMSA demostraron que los cambios en la abundancia proteica de estas especies eran consistentes con cambios en las respectivas concentraciones de RNA mensajero, en todos los casos, resultado de la regulación transcripcional de FurA dependiente del metal correpresor y condiciones reductoras.

Las nuevas dianas de FurA identificadas pertenecían a categorías funcionales diversas incluyendo la fotosíntesis, el metabolismo energético, las defensas frente al daño oxidativo, la replicación de ácidos nucleicos, etc. (González *et al.*, 2011). Una vez más, los cambios más acusados en la expresión proteica se reflejaban en las enzimas de defensa frente a estrés oxidativo. Estudios recientes sugieren que a diferencia de *Synechocystis* sp., cuyo principal mecanismo antioxidante lo constituye la catalasa KatG, en *Anabaena* sp. los mecanismos de protección frente al daño oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno recaen fundamentalmente en las peroxirredoxinas (Pascual *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2009). Bajo un fondo de sobreexpresión de FurA, la 2-Cys peroxirredoxina Alr4641 (Boileau *et al.*, 2011; Pascual *et al.*, 2010) y la peroxirredoxina dependiente de glutatión All1541 (Banerjee *et al.*, 2012b) disminuyeron en casi 7 veces su abundancia bajo condiciones de cultivo estándar. A diferencia de las peroxidases GCT1/GCT3 y las

superóxido-dismutasas Mn-SOD y Fe-SOD (González *et al.*, 2010), los genes para las peroxirredoxinas Alr4641 y All1541 sí constituían dianas directas de FurA (González *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que a pesar de esta marcada disminución en importantes defensas contra el daño oxidativo, los niveles de ROS producidos por la cepa AG2770FurA eran similares e incluso ligeramente inferiores a la estirpe silvestre (González *et al.*, 2010), los resultados avalaban una vez más el posible papel detoxificante intrínseco de la proteína FurA (Botello-Morte *et al.*, 2012).

El análisis proteómico comparativo de la cepa AG2770FurA permitió identificar dos dianas transcripcionales directas de FurA especialmente interesantes: la tiorredoxina-reductasa (*all0737*) y la proteína de unión al DNA, Apb1 (*all1940*).

El sistema tiorredoxina/tiorredoxina-reductasa dependiente de NADPH, conocido como sistema tiorredoxina, constituye un mecanismo ubicuo de regulación redox presente desde arqueas hasta mamíferos (Collet & Messens, 2010; Koharyova & Kolarova, 2008). La tiorredoxina actúa como reductasa sobre proteínas oxidadas rompiendo puentes disulfuro y luego restablece su estado reducido a expensas del NADPH en una reacción mediada por la tiorredoxina-reductasa. El sistema tiorredoxina modula de esta forma la actividad de numerosas enzimas según el potencial redox, protege proteínas celulares de la agregación o inactivación por daño oxidativo y constituye uno de los principales mecanismos responsables del ambiente reductor del citoplasma bacteriano (Collet & Messens, 2010; Prinz *et al.*, 1997). En organismos fotosintéticos como plantas, algas y cianobacterias el sistema tiorredoxina juega un importante papel regulador en la fotosíntesis (Lindahl & Florencio, 2003; Michalska *et al.*, 2009). Varias enzimas fotosintéticas son reguladas según la intensidad de luz a través de una cascada de reacciones redox mediada por un sistema ferredoxina/tiorredoxina independiente de NADPH (Fig. D.1). Adicionalmente, el sistema tiorredoxina juega un papel esencial en la protección frente al estrés oxidativo en

organismos fotosintéticos, regenerando el centro activo de las peroxirredoxinas (Pérez-Pérez *et al.*, 2009).

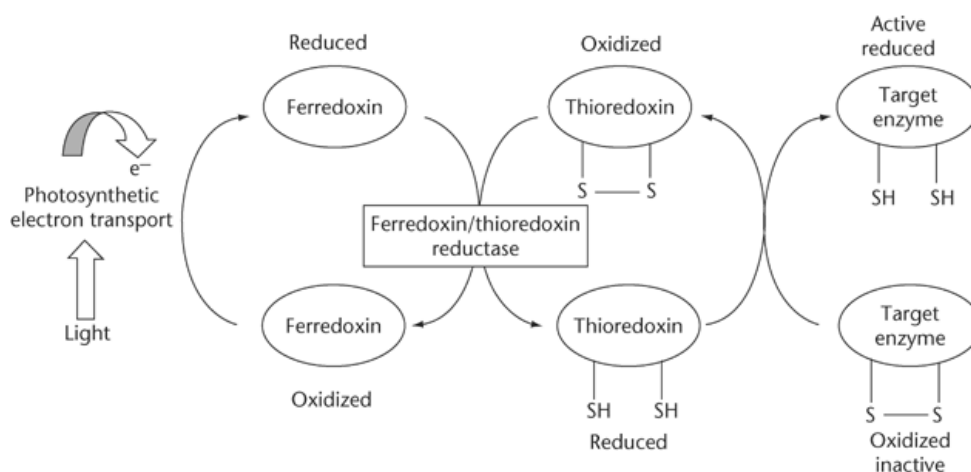


Figura D.1. Regulación enzimática mediada por la luz a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina (Imagen tomada de Raines & Lloyd, 2007).

En plantas, algas y algunas cianobacterias se han descrito recientemente proteínas donde el sistema de dos componentes tiorredoxina/tiorredoxina reductasa tiene lugar en una única entidad proteica; es decir, una tiorredoxina-reductasa dependiente de NADPH que presenta un dominio de tiorredoxina en su extremo carboxilo terminal, conocida también como tiorredoxina-reductasa C o NTRC (Cejudo *et al.*, 2012; Pascual *et al.*, 2011; Perez-Ruiz *et al.*, 2006; Spinola *et al.*, 2008).

La nueva clase de enzima, exclusiva de organismos fotosintéticos, permite el uso del NADPH como donador de electrones alternativo a la ferredoxina y juega un papel relevante como reductor de las peroxirredoxinas durante los períodos de oscuridad (Perez-Ruiz *et al.*, 2006). En *Anabaena* sp. PCC 7120, el gen *all0737* regulado por FurA (González *et al.*, 2011) es una NTRC, capaz de complementar *in vivo* la delección del gen *ntrc* en *Arabidopsis thaliana* (Pascual *et al.*, 2011). En conjunto, la modulación transcripcional de FurA sobre los genes de importantes peroxirredoxinas y de la

tioredoxina-reductasa C sugieren un papel protagonista de este metalorregulador en el control de las defensas frente al daño oxidativo en *Anabaena* sp.

El análisis proteómico permitió identificar otra diana transcripcional de FurA de particular interés dada su función en la fisiología de *Anabaena* sp., la proteína de unión a DNA Abp1 (Koksharova & Wolk, 2002b). Las proteínas Abp1, Abp2, Abp3 y Abp4 presentan un nivel de expresión basal bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno combinado, pero su expresión está ligada al desarrollo del heterocisto y es inducida bajo situación de deficiencia de nitrógeno. Estas proteínas funcionan como reguladores transcripcionales en el proceso de diferenciación a heterocistos, actuando presumiblemente como activadores de la expresión de *hepC*. La función de HepC se desconoce con exactitud (Zhu *et al.*, 1998). Aunque *hepC* no parece codificar una proteína de unión a DNA, su delección conlleva a una expresión constitutiva del gen adyacente *hepA* y a un fenotipo Fox⁻ (Ernst *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2005), caracterizado por una deficiencia en la síntesis de la capa de exopolisacárido de la envoltura del heterocisto y por consiguiente la incapacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aerobias. Las proteínas Abp1 (*all1940*) y Abp2 (*all1939*) están codificadas por un posible operón. La delección de Abp1 conlleva a un retardo de 12-14 horas en la inducción de los genes *hepC* y *hepA* en comparación con la estirpe silvestre, mientras la delección de Abp2 desencadena un fenotipo Fox⁻ (Koksharova & Wolk, 2002b). El control transcripcional de FurA sobre el operón *abp1-abp2* (González *et al.*, 2011), unido al resultado de estudios previos obtenidos en nuestro laboratorio (López-Gomollón *et al.*, 2007a; López-Gomollón *et al.*, 2007b), sugerían un papel relevante de FurA en el metabolismo del nitrógeno, especialmente en el proceso de diferenciación a heterocistos.

El empleo de la estirpe de sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. como herramienta de estudio, así como la aplicación conjunta de análisis fenotípicos, estudios de expresión

génica y proteica y ensayos de afinidad *in vitro* del metalorregulador permitieron identificar una variedad de dianas transcripcionales directas de FurA pertenecientes a diversas categorías funcionales, incluyendo la homeostasis del hierro, las defensas frente al daño oxidativo, la fotosíntesis, la diferenciación a heterocistos, la morfología celular, el metabolismo energético, entre otros procesos fisiológicos.

Por su importancia, los resultados de estudios ulteriores sobre el papel de FurA como regulador máster de la homeostasis del hierro en *Anabaena* sp., así como su implicación en la diferenciación a heterocistos serán analizados más adelante en capítulos independientes de esta discusión. De forma general, los resultados obtenidos durante el transcurso de este trabajo de tesis demuestran que la proteína FurA de *Anabaena* sp. constituye un regulador global de la transcripción en cianobacterias (Fig. D.2).

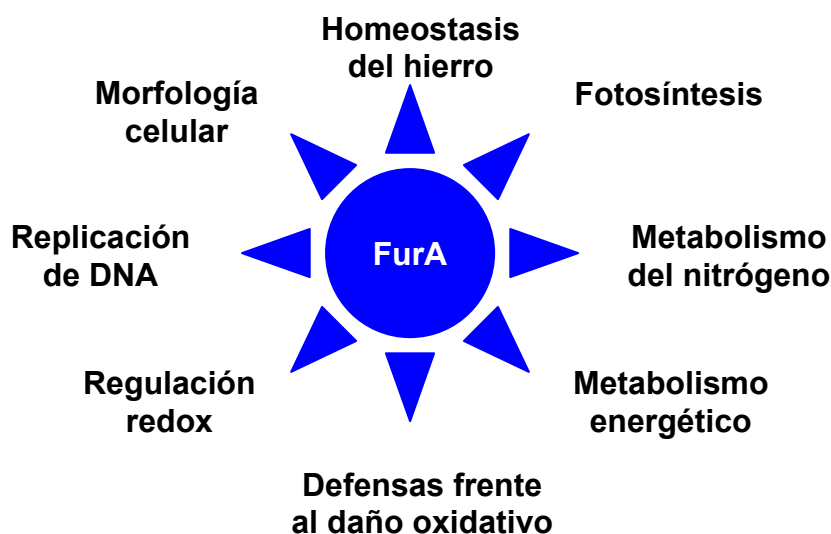


Figura D.2. FurA es un regulador global de la transcripción en cianobacterias.

FurA es el regulador máster de la homeostasis del hierro

Desde el descubrimiento de la regulación Fur sobre los sistemas de adquisición de hierro en *S. typhimurium* en 1978 (Ernst *et al.*, 1978) hasta la actualidad, los estudios funcionales

de estos metalorreguladores en bacterias heterotróficas han permitido la definición de los regulones Fur y la comprensión de los mecanismos de regulación de la homeostasis del hierro en una variedad de especies bacterianas (Bagg & Neilands, 1987; Delany *et al.*, 2001; Baichoo *et al.*, 2002; Mase & Gottesman, 2002; McHugh *et al.*, 2003; Danielli *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2010; Butcher *et al.*, 2012). Comparativamente, poco se conoce sobre el papel de las proteínas Fur en la regulación de la homeostasis del hierro en cianobacterias (Hernández *et al.*, 2007; Shcolnick *et al.*, 2009), a pesar del gran número de estudios relacionados con la respuesta y aclimatación de estos organismos al estrés férrico (Alexova *et al.*, 2011; Ferreira & Strauss, 1994; Shi *et al.*, 2007; Singh & Sherman, 2000; Singh *et al.*, 2003) o la creciente identificación de genes implicados en el transporte y almacenamiento de hierro en la célula (Jeanjean *et al.*, 2008; Katoh *et al.*, 2001; Mirus *et al.*, 2009; Nicolaisen *et al.*, 2008; Shcolnick *et al.*, 2007; Stevanovic *et al.*, 2012).

La sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. condujo a la identificación del transportador de sideróforos SchT (Nicolaisen *et al.*, 2008) como diana transcripcional directa de este metalorregulador, constituyendo quizás el primer reporte de regulación Fur en cianobacterias sobre un gen involucrado directamente en la adquisición y transporte de hierro (González *et al.*, 2010). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que FurA se inducía ligeramente bajo situación de estrés férrico (Hernández *et al.*, 2002) o estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009) y parecía regular la expresión de la proteína de estrés férrico IsiB (flavodoxina) (Hernández *et al.*, 2006a) y la proteína homóloga a DpsA de *Synechococcus* (Hernández *et al.*, 2007; Peña & Bullerjahn, 1995).

El estudio comparativo de la expresión génica de la estirpe de sobreexpresión de FurA bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro permitió la identificación de una variedad de genes implicados en el metabolismo del hierro, cuya expresión es regulada por

FurA en dependencia de la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo (González *et al.*, In press). Las nuevas dianas transcripcionales (Fig. D.3) incluían genes implicados en la síntesis de sideróforos, transportadores de membrana externa e interna para complejos sideróforo-Fe³⁺, así como ferritinas de tipo Dps homólogas a la proteína MrgA de *Synechocystis* (Shcolnick *et al.*, 2007).

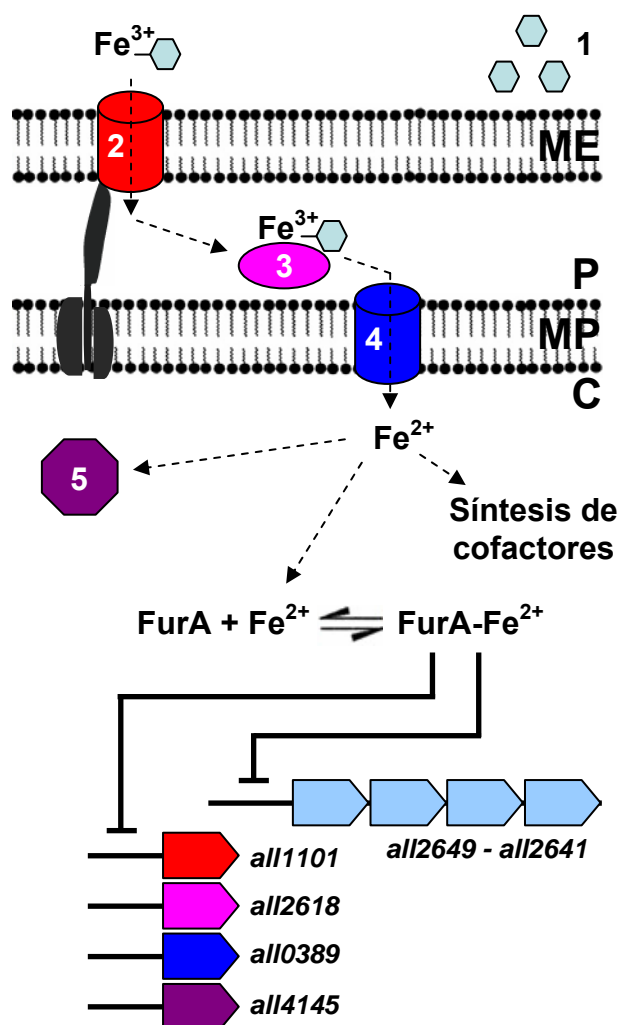


Figura D.3. FurA es el regulador máster de la homeostasis del hierro en *Anabaena* sp. PCC 7120. En la figura se representan algunas de las dianas directas de FurA implicadas en la adquisición, transporte y almacenamiento del hierro. (1) Síntesis de sideróforos, (2) receptores de membrana externa dependientes de TonB, (3) proteínas periplasmáticas de transporte, (4) transportadores de tipo ABC, (5) ferritinas. (ME) Membrana externa, (P) periplasma, (MP) membrana citoplasmática, (C) citoplasma.

En todos los casos, los cambios en la expresión génica respondían a un típico patrón de represión transcripcional mediada por FurA: los genes eran fuertemente inducidos en la estirpe silvestre bajo situación de estrés férrico, pero esta inducción disminuía notablemente con la sobreexpresión del metalorrepresor en la cepa AG2770FurA. Curiosamente, todos los genes de respuesta a deficiencia de hierro aparecían ligeramente inducidos en la cepa AG2770FurA bajo situación de suficiencia de hierro en el medio de cultivo, corroborando la hipótesis de una posible reducción súbita de las reservas de hierro libre citosólico con la sobreexpresión de FurA (González *et al.*, 2010).

Una de las vías más importantes de consumo de hierro en la célula la constituye la síntesis de hemo. El hemo es un tetrapirrol cíclico que contiene un átomo de Fe^{2+} como grupo prostético y forma parte de la estructura biológicamente activa de citocromos y enzimas, siendo esencial para procesos vitales como la fotosíntesis, la respiración o las defensas frente a estrés oxidativo. En cianobacterias, el hemo constituye además un intermediario esencial en la síntesis de las ficobilinas (Brown *et al.*, 1990), pigmentos fotosintéticos accesorios que conforman las ficobiliproteínas. La clorofila, el hemo y las ficobilinas comparten una ruta biosintética común hasta la síntesis de la protoporfirina IX, donde la síntesis de tetrapirroles se bifurca en dos ramas en dependencia de la enzima que inserta el ión metálico central (Fe^{2+} o Mg^{2+}) en el anillo tetrapirrólico (Cornah *et al.*, 2003). Dada la alta toxicidad de los intermediarios metabólicos y los diferentes requerimientos de cada uno de sus productos finales, la biosíntesis de tetrapirroles es una ruta altamente regulada tanto a nivel transcripcional (Aoki *et al.*, 2012; Zappa *et al.*, 2010) como postranscripcional (Czarnecki & Grimm, 2012). En esta regulación génica influyen frecuentemente los niveles de hierro en el interior celular (Chauhan *et al.*, 1997; Taketani *et al.*, 2000).

El estudio comparativo de la expresión génica en respuesta a la disponibilidad de hierro en la estirpe de sobreexpresión de FurA demostró la influencia directa de este metalorregulador transcripcional en la expresión de al menos cinco enzimas implicadas en la síntesis de tetrapirroles: la porfobilinógeno-sintasa (*hemB*), la porfobilinógeno-desaminasa (*hemC*), la protoporfirinógeno-oxidasa (*hemK*), la ferroquelatasa (*hemH*) y la hemo-oxigenasa I (*hoI*) (Aoki *et al.*, 2011; Layer *et al.*, 2010). Curiosamente, la sobreexpresión del regulador en *Anabaena* sp. producía dos patrones transcripcionales diferentes en las nuevas dianas en dependencia de la disponibilidad de hierro. Mientras los genes *hemB*, *hemC* y *hoI* mostraban el patrón transcripcional típico de una represión mediada por FurA, la sobreexpresión del metalorregulador conllevaba sin embargo a una apreciable inducción de la expresión de *hemK* y *hemH*, en relación a lo observado en la estirpe silvestre con independencia de la disponibilidad de hierro (González *et al.*, In press). Esta capacidad regulatoria dual (activación y represión) ejerciéndose de forma simultánea sobre la síntesis de tetrapirroles había sido previamente observada en otros reguladores transcripcionales bacterianos (Zappa *et al.*, 2010), pareciendo facilitar un necesario ajuste entre los pasos enzimáticos iniciales y finales de la ruta.

Los resultados obtenidos sugerían por primera vez un papel activador directo de FurA sobre la transcripción de algunos genes diana, de forma similar a lo reportado con anterioridad para otros homólogos Fur (Delany *et al.*, 2004). En tal sentido, el regulador funcionará para algunos promotores diana como represor transcripcional bloqueando el sitio de unión de la RNA polimerasa; para otros promotores en cambio, la unión del mismo regulador podría producir un cambio conformacional en la molécula de DNA haciendo más accesible el sitio de unión de la polimerasa (Lloyd *et al.*, 2001). De la misma forma, los resultados demostraban por primera vez la influencia directa de una proteína Fur en la regulación transcripcional de la vía de síntesis de tetrapirroles como respuesta a la

disponibilidad de hierro, más allá del mecanismo de regulación Irr de proteobacterias alfa (Qi & O'Brian, 2002; Small *et al.*, 2009).

FurA participa en la diferenciación a heterocistos

Algunas especies de cianobacterias filamentosas son capaces de experimentar diferentes tipos de diferenciación celular, constituyendo un ejemplo modélico de multicelularidad en organismos procariontes (Flores & Herrero, 2010). En ausencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo, en *Anabaena* sp. PCC 7120 se activa una compleja cascada regulatoria a nivel de expresión génica que conlleva a la inducción de unos genes, el silenciamiento de otros e incluso la remoción y reordenamiento de algunas secuencias génicas en el cromosoma. Esta marcada variación en la expresión génica que ocurre de forma progresiva y programada en algunas de las células del filamento da lugar a profundos cambios morfológicos y fisiológicos que tienen como resultado final la aparición de un tipo celular especializado en la fijación de nitrógeno atmosférico, los heterocistos (Flores & Herrero, 2010; Kumar *et al.*, 2010). Los cambios en la expresión génica ligados al desarrollo del heterocisto están sumamente controlados tanto espacial como temporalmente, de forma tal que en condiciones normales, la diferenciación tiene lugar en 1 de cada 8-10 células del filamento, dando lugar a heterocistos maduros completamente activos tras 24 horas desde que es iniciado el proceso de diferenciación. En este proceso juegan un papel primordial dos reguladores transcripcionales: el regulador global del metabolismo del nitrógeno, NtcA (Herrero *et al.*, 2004) y el regulador máster de la diferenciación a heterocistos, HetR (Buikema & Haselkorn, 2001). NtcA detecta la acumulación de 2-oxoglutarato que se produce en la célula como consecuencia de un déficit de nitrógeno combinado y activa la expresión de HetR (Ehira & Ohmori, 2006a; Muro-Pastor *et al.*, 2001). HetR a su vez tiene un efecto activador recíproco sobre la expresión de NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2002). Esta

mutua inducción de ambos reguladores transcripcionales da lugar a un incremento súbito y transitorio de NtcA y HetR en las primeras horas del proceso de diferenciación, el cual resultará esencial para la ulterior expresión de una variedad de nuevos genes y reguladores transcripcionales que participan en el desarrollo y maduración del heterocisto. La inducción o represión de la gran mayoría de los genes implicados en la diferenciación no ocurre al unísono; los cambios transcripcionales van ligados al desarrollo del heterocisto, lo cual determina que la síntesis y acción de determinado regulador o producto génico ocurra en un determinado momento del desarrollo, y muchas veces su efecto es sólo transitorio, llegando a ser inaparente o nulo en otro estadio de la diferenciación (Flaherty *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2010).

La fijación biológica del nitrógeno por las cianobacterias y el proceso de diferenciación a heterocisto están influenciados por la disponibilidad de hierro (Kustka *et al.*, 2002; Sohm *et al.*, 2011). La diazotrofia impone requerimientos adicionales de hierro dado el alto contenido de este metal en la enzima nitrogenasa. Estudios *in vivo* han demostrado que las cianobacterias diazotróficas sacrifican el proceso de fijación del nitrógeno en ambientes con limitación combinada de hierro y nitrógeno, en aras de garantizar funciones esenciales con alto consumo de hierro como la fotosíntesis o la respiración aerobia (Kupper *et al.*, 2008). De la misma forma, el proceso de diferenciación a heterocistos resulta severamente afectado e incluso totalmente inhibido en condiciones de estrés férrico (Wen-Liang *et al.*, 2003).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado un incremento de la expresión de FurA dependiente de NtcA en proheterocistos durante las primeras horas del proceso de diferenciación, alcanzando un máximo de expresión pasadas ~15 horas de la deficiencia de nitrógeno y manteniéndose luego constante en el heterocisto maduro, aproximadamente 2,3 veces el nivel de expresión observado en las células vegetativas (López-Gomollón *et al.*,

2007b). Estudios *in vitro* sugieren además una mutua regulación de NtcA y FurA, así como la existencia de dianas transcripcionales comunes en ambos regulones (López-Gomollón *et al.*, 2007a).

La sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo condujo a una inhibición parcial del proceso de diferenciación a heterocistos (González *et al.*, In revision). El proceso de diferenciación en la estirpe de sobreexpresión fue bloqueado en sus estadios iniciales, afectándose al menos la síntesis y deposición de la capa de exopolisacárido (HEP) que garantiza la capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones aerobias. La sobreexpresión de FurA provocó una disminución apreciable en la abundancia de RNAm de *ntcA*, afectando sensiblemente el incremento transitorio que tiene lugar en las primeras horas del desarrollo del heterocisto (Muro-Pastor *et al.*, 2002). La expresión de varios genes implicados directamente en la síntesis de la capa HEP, incluyendo *hepA*, *hepB*, *hepC*, *hepK* y *abp2* (Huang *et al.*, 2005; Koksharova & Wolk, 2002b; Wang *et al.*, 2007; Zhou & Wolk, 2003) también se vió sensiblemente disminuida en la estirpe AG2770FurA, aunque a excepción de *abp2* (González *et al.*, 2011), esta disminución pareció consecuencia de un efecto indirecto del regulador y no a una modulación transcripcional directa. Estudios de afinidad *in vitro* demostraron que FurA reconoce y se une específicamente al promotor de *ntcA* y *hetR*, aunque la influencia *in vivo* de FurA sobre la expresión de *hetR* fue discreta, al menos bajo las condiciones de cultivo empleadas en nuestros experimentos (González *et al.*, In revision).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la expresión de FurA en el heterocisto está ligada al desarrollo del mismo, es regulada por NtcA y su abundancia en cada momento influirá directamente en el transcurso normal del proceso de diferenciación. Los resultados indican una regulación negativa de la expresión de NtcA por FurA en la segunda

mitad del proceso de desarrollo del heterocisto: el incremento súbito pero transitorio de NtcA en las primeras 8-12 horas de diferenciación (Muro-Pastor *et al.*, 2002) disminuye precisamente cuando los niveles de FurA en el heterocisto alcanzan un valor máximo (López-Gomollón *et al.*, 2007b). De forma consistente con esta hipótesis, el área protegida por FurA sobre el promotor de *ntcA* se extiende sobre los sitios de inicios de la transcripción (tsp) utilizados de forma transitorio en la expresión de NtcA durante el desarrollo del heterocisto (Herrero *et al.*, 2004), mientras aquel “tsp” que se mantiene activo en los heterocistos maduros parece escapar del control de FurA según los análisis de *footprinting* (González *et al.*, In revision). En tal sentido, FurA parece funcionar como un interruptor de la expresión de *ntcA*, que regula adecuadamente los niveles de NtcA en las diferentes fases de desarrollo del heterocisto, de forma similar a acción de PknE sobre la expresión de *hetR* (Saha & Golden, 2011).

La diferenciación a heterocistos es un proceso altamente complejo, regulado a diferentes niveles y en el que intervienen un gran número de genes y reguladores transcripcionales, tanto activadores como represores, cuyo papel en la mayoría de los casos resulta esencial para que el heterocisto alcance la madurez funcional. Aunque FurA podría estar directamente involucrada en la regulación transcripcional de varios de los genes implicados en el desarrollo del heterocisto [Ej: *abp1-abp2* (González *et al.*, 2011)], su influencia en la modulación transcripcional de los niveles de NtcA revisten especial importancia. NtcA es el regulador global del metabolismo del nitrógeno y esencial activador de una variedad de genes implicados en el desarrollo y función del heterocisto como *hetR* (Muro-Pastor *et al.*, 2002), *hetC* (Muro-Pastor *et al.*, 1999), *devBCA* (Fiedler *et al.*, 2001), entre otros (Olmedo-Verd *et al.*, 2005). Controlando la expresión de *ntcA*, FurA se convierte en un punto clave de conexión entre la homeostasis del hierro y el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias.

Unión de FurA al DNA

La unión de las proteínas Fur a sus promotores diana se encuentra usualmente gobernada por el reconocimiento de una secuencia específica dentro del promotor conocida como “caja Fur” o “*iron box*”. El estudio de múltiples promotores regulados por proteínas Fur en diferentes microorganismos ha permitido la definición de secuencias de unión consenso (De Lorenzo *et al.*, 1987; Ochsner & Vasil, 1996; Sebastian *et al.*, 2002), las cuales pretenden explicar la especificidad del reconocimiento y la estequiometría de la unión DNA-regulador. Así por ejemplo, el análisis mediante *footprinting* de más de 30 promotores génicos que respondían a la disponibilidad de hierro en *E. coli* conllevó a la definición de una secuencia de unión consenso de 19pb (De Lorenzo *et al.*, 1987), inicialmente interpretada como un palíndromo de 9 pb repetidas e invertidas (9-1-9) o un tándem de hexámeros (6-6-6) (Escolar *et al.*, 1999) y posteriormente reinterpretada como motivos de unión solapantes dispuestos como “6-1-6” (Lavrrar *et al.*, 2002) o “7-1-7” (Baichoo & Helmann, 2002). La unión de la proteína a estas secuencias se produce al parecer de modo cooperativo, ocurriendo la unión de más de un dímero de Fur a la secuencia del operador y polimerizando helicoidalmente a lo largo del promotor (Escolar *et al.*, 1999).

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo varios estudios con el objetivo de definir una secuencia regulatoria consenso de FurA en *Anabaena* sp. PCC 7120 (González *et al.*, 2011; González *et al.*, In press; Hernández *et al.*, 2006a). Análisis de *footprinting* a los promotores de los genes *furA* e *isiB* habían permitido definir previamente dos regiones de protección a la acción de la DNasa I en cada uno de los promotores estudiados, las cuales podían interpretarse como agrupaciones de varios motivos consecutivos ricos en A/T (Hernández *et al.*, 2006a). Aunque las regiones protegidas compartían un 42-58% de identidad con la secuencia consenso de *E. coli*, la escasa homología entre ellas no permitía

definir con certeza una secuencia consenso de FurA. De forma similar, el alineamiento de las regiones promotoras completas de los nuevos genes diana identificados durante el transcurso de esta tesis tampoco evidenciaba una alta homología (González *et al.*, 2011).

En un intento por definir la mínima unidad funcional de caja Fur dentro del promotor *furA* que garantiza una unión fuerte y específica del regulador a su promotor diana, se realizó un análisis de la afinidad *in vitro* de FurA a nueve secuencias solapadas de 300-400 pb dentro del promotor *furA* que progresivamente fueran excluyendo, cada vez, pequeñas regiones (15-20 pb) dentro de los sitios de unión previamente definidos en los ensayos de *footprinting*. Los resultados demostraban que la exclusión de cualquier pequeño fragmento de las dos secuencias protegidas en el *footprinting* determinaba una disminución de la afinidad de FurA a su promotor, en comparación con la afinidad mostrada por el regulador a la secuencia promotora completa (González *et al.*, 2011). Sin embargo, un fuerte y bien definido retardo de la movilidad electroforética se pudo apreciar empleando la secuencia promotora que incluía, al menos, toda la región protegida comprendida entre las posiciones -67 y -31 respecto al punto de inicio de la transcripción. Tomando como base este resultado, se evaluó la afinidad de FurA a una pequeña secuencia de 27 pb que incluía exclusivamente los posibles motivos de unión que potencialmente garantizaban la mayor afinidad *in vitro*. Sin embargo, la afinidad del regulador por esta pequeña secuencia fue notoriamente escasa (González *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos sugerían que independientemente de la posible existencia de una secuencia regulatoria o caja Fur que gobernara el reconocimiento y unión del metalorregulador al DNA, la estabilidad de esta unión parecía depender de la conformación que adquiría la molécula de ácido nucleico en el sitio de unión, la cual sólo parecía establecerse en un fragmento de DNA mayor a aquel restringido al sitio de unión. La escasa homología observada entre los diferentes promotores diana identificados hasta el momento podría sugerir además la posible

inexistencia de una secuencia consenso definida que regulara la unión de FurA al DNA, de forma similar a lo descrito para *H. pylori* (Carpenter *et al.*, 2009), donde la regulación transcripcional de Fur parecía estar gobernada primariamente por una conformación particular del DNA en los promotores diana y no por una secuencia de unión específica.

La ulterior identificación de un mayor número de genes diana con una clara respuesta a la disponibilidad de hierro permitió definir mediante ensayos de *footprinting* las secuencias de una variedad de sitios de unión de FurA (González *et al.*, In press). El alineamiento de las secuencias de al menos 8 sitios de unión definidos por *footprinting*, pertenecientes a 6 dianas directas de FurA dependientes de hierro, condujo a la identificación de una posible secuencia regulatoria consenso de 23 pb (Fig. D.4). En la misma se lograban definir, mediante análisis *in silico* empleando matrices de peso correspondientes a varias proteínas Fur (Munch *et al.*, 2005), al menos tres motivos de unión Fur reconocidos de 8 pb en disposición “*head-to-head-to-tail*” (González *et al.*, In press).

Resulta importante tener en cuenta que las secuencias reguladoras consenso definidas para las proteínas Fur no constituyen secuencias reales, no aparecen de forma natural en los promotores diana; estas son el resultado de la comparación y estudio de una variedad de sitios de unión empíricamente demostrados para cada organismo. Cada uno de los nucleótidos que definen la secuencia consenso representa en realidad aquel encontrado con mayor probabilidad en esa posición en las secuencias de unión reales. De esta forma, la homología entre la secuencia consenso y las posibles secuencias de unión reales puede variar considerablemente. En *P. aeruginosa*, la homología entre la secuencia consenso y las cajas Fur de una variedad de promotores diana determinados empíricamente oscilaba entre un 53 y un 79% (Ochsner & Vasil, 1996). La homología entre la secuencia reguladora consenso definida para FurA y 11 posibles secuencias de unión o cajas FurA reales pertenecientes a dianas transcripcionales de diversas categorías funcionales osciló

entre un 56,5 y un 82,6% (Fig. D.4). Curiosamente, la caja FurA que hasta el momento muestra la mayor homología a la secuencia consenso pertenece al promotor del propio gen *furA*, utilizado usualmente como diana de referencia en los estudios de unión *in vitro* dada la alta afinidad de unión con FurA.

NRPS-PKS_P1	TAATA G-AA ACTT GCA AT AATAA	73.9%
<i>hemC</i>	TGACAATA GAAATCA GAAATGT	56.5%
<i>all1101</i>	TGCTA--AATCTTGATAATATGT	56.5%
<i>hol</i>	TAATA TAAATTCTCATCAAATAG	78.3%
<i>furA</i> sitio 1	TAATAAA TATTCTCAATAAGCAA	82.6%
<i>furA</i> sitio 2	TGTTA-TATTCTCAATTAA CAA	70.8%
<i>isiB</i> sitio 1	TGCAAAATAGTCTCAATAAAATCT	73.9%
<i>isiB</i> sitio 2	TGAATAAAATATCAATAAGTTA	73.9%
<i>ntcA</i>	CTAGCTAAAAATAGCAAAAGTTG	56.5%
<i>hetR</i> sitio 1	--CTAGTTATATGCCATAAATTA	60.9%
<i>hetR</i> sitio 2	--AGATAAATATAGAATATTATG	60.9%
FurA Consensus	TGATAAAAATTCTCAATAAATAA	

Figure D.4. Posible secuencia reguladora consenso de FurA y homología con posibles secuencias de unión de diferentes promotores diana analizados mediante ensayos de *footprinting*. Los nucleótidos idénticos a la secuencia consenso han sido sombreados en azul.

Aunque la presencia de posibles cajas Fur que muestren una alta homología a la secuencia consenso sea un elemento favorable a tener en cuenta en el estudio de nuevas dianas transcripcionales, su ausencia no deberá representar un factor excluyente. Varios de los genes regulados por Fur en respuesta a la disponibilidad de hierro en *N. meningitidis* no mostraron una alta homología con la secuencia consenso (Grifantini *et al.*, 2003). La unión efectiva a secuencias alejadas del consenso ha sido descrita igualmente para otros reguladores transcripcionales ampliamente estudiados (Camargo *et al.*, 2012). En cualquier caso, el empleo de las secuencias reguladoras consenso y las matrices de peso generadas a partir de secuencias de unión reales determinadas experimentalmente ha demostrado constituir una herramienta de innegable valor en la predicción bioinformática de nuevas

dianas transcripcionales y el estudio de regulones bacterianos (da Silva Neto *et al.*, 2009; López-Gomollón *et al.*, 2007a; Quatrini *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- La proteína FurA es un regulador global de la transcripción en cianobacterias, interconectando la homeostasis del hierro con otros múltiples procesos celulares, incluyendo la respuesta a estrés oxidativo, la fotosíntesis, la diferenciación a heterocistos, la morfología celular, el metabolismo energético, la replicación del DNA y la regulación redox, entre otras.
- La sobreexpresión del regulador transcripcional FurA en *Anabaena* sp. demostró ser una herramienta eficaz para el estudio del regulón. El análisis de los cambios fenotípicos en la estirpe de sobreexpresión AG2770FurA, en combinación con estudios comparativos de la expresión génica y ensayos de la afinidad *in vitro* del metalorregulador permitieron la identificación de una variedad de dianas transcripcionales directas.
- La sobreexpresión de FurA en *Anabaena* sp. provocó cambios en el patrón transcripcional de múltiples genes, incluyendo dianas directas y otros genes, ocasionando alteraciones tanto morfológicas como fisiológicas.
- La marcada disminución en la expresión de defensas relevantes frente a estrés oxidativo, sin un asociado incremento de los niveles de ROS, sugieren un posible papel detoxificante intrínseco de la proteína FurA más allá de su función como regulador transcripcional.
- FurA actúa simultáneamente como represor y activador transcripcional en la ruta de biosíntesis de tetrapirroles. La acción activadora de FurA sobre la transcripción de los genes *hemK* (protoporfirinógeno-oxidasa) y *hemH* (ferroquelatasa) constituye el primer ejemplo documentado de activación transcripcional directa de una proteína Fur en cianobacterias.

- La sobreexpresión de FurA bloquea parcialmente la diferenciación a heterocistos, inhibiendo fuertemente el incremento transitorio de NtcA que ocurre en estadios tempranos del proceso de diferenciación. La proteína FurA modula al menos la expresión de *ntcA*, *hetR* y *abp1-abp2*. El potencial papel de FurA en la modulación del proceso de diferenciación a heterocistos parece constituir una de las claves de la conexión observada entre los metabolismos del hierro y del nitrógeno en cianobacterias en ambientes naturales.
- La afinidad *in vitro* de FurA a todos sus promotores diana estudiados hasta el momento, con independencia de la categoría funcional a la que pertenecen, depende fuertemente de la presencia de metales divalentes y condiciones reductoras. Estos resultados avalan la hipótesis de la influencia del metal correpresor y el estado redox como factores que modulan la actividad de FurA *in vivo*.
- Los resultados de estudios mediante *footprintings* y análisis *in silico* de varios promotores diana permitieron definir en *Anabaena* sp. una posible secuencia reguladora consenso de 23 pb, con al menos tres motivos de unión Fur de 8 pb en disposición “*head-to-head-to-tail*”.

BIBLIOGRAFÍA

Abed, R. M., Dobretsov, S. & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol* **106**, 1-12.

Adams, D. G. & Duggan, P. S. (2008). Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *J Exp Bot* **59**, 1047-1058.

Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 6248-6260.

Agervald, A., Zhang, X., Stensjo, K., Devine, E. & Lindblad, P. (2010). CalA, a cyanobacterial AbrB protein, interacts with the upstream region of *hypC* and acts as a repressor of its transcription in the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *Appl Environ Microbiol* **76**, 880-890.

Ahmad, R., Hjerde, E., Hansen, G. A., Haugen, P. & Willassen, N. P. (2009). Prediction and experimental testing of ferric uptake regulator regulons in vibrios. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**, 159-168.

Ahmadjian, V. (1993). *The lichen symbiosis*. New York ; Chichester: Wiley.

Ahn, B. E., Cha, J., Lee, E. J., Han, A. R., Thompson, C. J. & Roe, J. H. (2006). Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **59**, 1848-1858.

Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T. D., Ferrari, B. C. & Neilan, B. A. (2011). Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ Microbiol* **13**, 1064-1077.

Althaus, E. W., Outten, C. E., Olson, K. E., Cao, H. & O'Halloran, T. V. (1999). The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**, 6559-6569.

Allen, A. E., Laroche, J., Maheswari, U., Lommer, M., Schauer, N., Lopez, P. J., Finazzi, G., Fernie, A. R. & Bowler, C. (2008). Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* to iron starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10438-10443.

Allen, M. M. (1984). Cyanobacterial cell inclusions. *Annu Rev Microbiol* **38**, 1-25.

Andrews, S. C. (1998). Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **40**, 281-351.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.

- Aoki, R., Goto, T. & Fujita, Y. (2011).** A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt to low oxygen environments in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol* **52**, 1744-1756.
- Aoki, R., Takeda, T., Omata, T., Ihara, K. & Fujita, Y. (2012).** MarR-type transcriptional regulator ChlR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in cyanobacteria. *J Biol Chem* **287**, 13500-13507.
- Arner, E. S. & Holmgren, A. (2000).** Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**, 6102-6109.
- Aro, E. M., Virgin, I. & Andersson, B. (1993).** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**, 113-134.
- Bagg, A. & Neilands, J. B. (1987).** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 5471-5477.
- Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002).** Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**, 5826-5832.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J. D. (2002).** Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**, 1613-1629.
- Banerjee, M., Ballal, A. & Apte, S. K. (2012a).** Mn-catalase (Alr0998) protects the photosynthetic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 from oxidative stress. *Environ Microbiol* **14**, 2891-2900.
- Banerjee, M., Ballal, A. & Apte, S. K. (2012b).** A novel glutaredoxin domain-containing peroxiredoxin 'All1541' protects the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 from oxidative stress. *Biochem J* **442**, 671-680.
- Barrios-Llerena, M. E., Reardon, K. F. & Wright, P. C. (2007).** 2-DE proteomic analysis of the model cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Electrophoresis* **28**, 1624-1632.
- Barton, H. A., Johnson, Z., Cox, C. D., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1996).** Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* **21**, 1001-1017.
- Battisti, J. M., Smitherman, L. S., Sappington, K. N., Parrow, N. L., Raghavan, R. & Minnick, M. F. (2007).** Transcriptional regulation of the haem binding protein gene family of *Bartonella quintana* is accomplished by a novel promoter element and iron response regulator. *Infect Immun* **75**, 4373-4385.
- Bauer, C. C., Buikema, W. J., Black, K. & Haselkorn, R. (1995).** A short-filament mutant of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 that fragments in nitrogen-deficient medium. *J Bacteriol* **177**, 1520-1526.

- Beale, S. I. (1994).** Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls, and phycobilins. In: *The molecular biology of cyanobacteria*, pp. 519-558. Edited by D. A. Bryant. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Beers, R. F., Jr. & Sizer, I. W. (1952).** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* **195**, 133-140.
- Behrenfeld, M. J. & Kolber, Z. S. (1999).** Widespread iron limitation of phytoplankton in the south pacific ocean. *Science* **283**, 840-843.
- Bellini, P. & Hemmings, A. M. (2006).** In vitro characterization of a bacterial manganese uptake regulator of the fur superfamily. *Biochemistry* **45**, 2686-2698.
- Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A. H., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J. G. & Kist, M. (2000).** Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**, 5948-5953.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. & Falkowski, P. (2003).** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res Microbiol* **154**, 157-164.
- Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmuller, P. G., Peschek, G. A. & Obinger, C. (2009).** Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J Exp Bot* **60**, 423-440.
- Bes, M. T., Hernandez, J. A., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2001).** Cloning, overexpression and interaction of recombinant Fur from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 with *isiB* and its own promoter. *FEMS Microbiol Lett* **194**, 187-192.
- Bibby, T. S., Nield, J. & Barber, J. (2001).** Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature* **412**, 743-745.
- Bigas, A., Garrido, M. A., Badiola, I., Barbé, J. & Llagostera, M. (2006).** Non-viability of *Haemophilus parasuis* fur-defective mutants. *Vet Microbiol* **118**, 107-116.
- Bijlsma, J. J., Waidner, B., Vliet, A. H. & other authors (2002).** The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* **70**, 606-611.
- Bishop, C. L., Ulas, S., Baena-Gonzalez, E., Aro, E. M., Purton, S., Nugent, J. H. & Maenpaa, P. (2007).** The PsbZ subunit of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 modulates electron flow through the photosynthetic electron transfer chain. *Photosynth Res* **93**, 139-147.
- Bjarnason, J., Southward, C. M. & Surette, M. G. (2003).** Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **185**, 4973-4982.

- Black, T. A., Cai, Y. & Wolk, C. P. (1993).** Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol Microbiol* **9**, 77-84.
- Bland, J. M. & Altman, D. G. (1995).** Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* **310**, 170.
- Boekema, E. J., Hifney, A., Yakushevska, A. E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K. P., Pistorius, E. K. & Kruip, J. (2001).** A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* **412**, 745-748.
- Boileau, C., Eme, L., Brochier-Armanet, C., Janicki, A., Zhang, C. C. & Latifi, A. (2011).** A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in the reduction of the sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *New Phytol* **191**, 1108-1118.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M. & Bergey, D. H. (2001).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. New York: Springer.
- Botello-Morte, L., Calvo, V., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2012).** Cyanobacterial FurA protects from oxidative stress presumably by a disulfide bond-mediated mechanism. *FEBS J* **279** (Suppl.1), 196.
- Botello-Morte, L., González, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (In press).** Functional genomics of metalloregulators in cyanobacteria. *Adv Bot Res* **65**.
- Brown, S. B., Houghton, J. D. & Vernon, D. I. (1990).** Biosynthesis of phycobilins. Formation of the chromophore of phytochrome, phycocyanin and phycoerythrin. *J Photochem Photobiol B* **5**, 3-23.
- Brusca, J. S., Chastain, C. J. & Golden, J. W. (1990).** Expression of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *xisA* gene from a heterologous promoter results in excision of the *nifD* element. *J Bacteriol* **172**, 3925-3931.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. & Helmann, J. D. (1998).** *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**, 189-198.
- Bsat, N. & Helmann, J. D. (1999).** Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J Bacteriol* **181**, 4299-4307.
- Buikema, W. J. & Haselkorn, R. (1991).** Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes & Dev* **5**, 321-330.
- Buikema, W. J. & Haselkorn, R. (2001).** Expression of the *Anabaena hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2729-2734.

- Butcher, J., Sarvan, S., Brunzelle, J. S., Couture, J. F. & Stintzi, A. (2012).** Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 10047-10052.
- Cai, Y. P. & Wolk, C. P. (1990).** Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol* **172**, 3138-3145.
- Calderwood, S. B. & Mekalanos, J. J. (1988).** Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J Bacteriol* **170**, 1015-1017.
- Callahan, S. M. & Buikema, W. J. (2001).** The role of HetN in maintenance of the heterocyst pattern in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **40**, 941-950.
- Camargo, S., Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (2012).** Transcription activation by NtcA in the absence of consensus NtcA-binding sites in an *Anabaena* heterocyst differentiation gene promoter. *J Bacteriol* **194**, 2939-2948.
- Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., de Rozas, A. M., Badiola, I. & Barbe, J. (2002).** Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium* fur mutants. *Microbiology* **148**, 1039-1048.
- Carmichael, W. W. (1994).** The toxins of cyanobacteria. *Sci Am* **270**, 78-86.
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K. (2001).** Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* **109**, 663-668.
- Carpenter, B. M., Gancz, H., Gonzalez-Nieves, R. P., West, A. L., Whitmire, J. M., Michel, S. L. & Merrell, D. S. (2009).** A single nucleotide change affects fur-dependent regulation of *sodB* in *H. pylori*. *PLoS One* **4**, e5369.
- Carrasco, C. D., Ramaswamy, K. S., Ramasubramanian, T. S. & Golden, J. W. (1994).** *Anabaena xisF* gene encodes a developmentally regulated site-specific recombinase. *Genes & Dev* **8**, 74-83.
- Carrasco, C. D., Buettner, J. A. & Golden, J. W. (1995).** Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 791-795.
- Carrasco, C. D. & Golden, J. W. (1995).** Two heterocyst-specific DNA rearrangements of *nif* operons in *Anabaena cylindrica* and *Nostoc* sp. strain Mac. *Microbiology* **141** (Pt 10), 2479-2487.
- Carrasco, C. D., Holliday, S. D., Hansel, A., Lindblad, P. & Golden, J. W. (2005).** Heterocyst-specific excision of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *hupL* element requires *xisC*. *J Bacteriol* **187**, 6031-6038.

- Cavalier-Smith, T. (2002).** The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 7-76.
- Cejudo, F. J., Ferrandez, J., Cano, B., Puerto-Galan, L. & Guinea, M. (2012).** The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *FEBS Lett* **586**, 2974-2980.
- Collet, J. F. & Messens, J. (2010).** Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1205-1216.
- Cornah, J. E., Terry, M. J. & Smith, A. G. (2003).** Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci* **8**, 224-230.
- Cornelis, P., Matthijs, S. & Van Oeffelen, L. (2009).** Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**, 15-22.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C. & Vinckx, T. (2011).** Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **3**, 540-549.
- Coy, M. & Neilands, J. B. (1991).** Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* **30**, 8201-8210.
- Coy, M., Doyle, C., Besser, J. & Neilands, J. B. (1994).** Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* **7**, 292-298.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**, 1188-1190.
- Cunningham, L., Gruer, M. J. & Guest, J. R. (1997).** Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** (Pt 12), 3795-3805.
- Czarnecki, O. & Grimm, B. (2012).** Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *J Exp Bot* **63**, 1675-1687.
- Cha, M. K., Hong, S. K. & Kim, I. H. (2007).** Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Free Radic Biol Med* **42**, 1736-1748.
- Chauhan, S., Titus, D. E. & O'Brian, M. R. (1997).** Metals control activity and expression of the heme biosynthesis enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **179**, 5516-5520.
- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (2002).** Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16619-16624.
- da Silva Neto, J. F., Braz, V. S., Italiani, V. C. & Marques, M. V. (2009).** Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **37**, 4812-4825.

- Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Chiarini, V., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2006).** In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol* **188**, 4654-4662.
- Davie, J. J. & Campagnari, A. A. (2009).** Comparative proteomic analysis of the *Haemophilus ducreyi* porin-deficient mutant 35000HP::P2AB. *J Bacteriol* **191**, 2144-2152.
- Davies, B. H. (1976).** Carotenoids. In: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, pp. 38-165. Edited by T. W. Goodwin. New York: Academic Press.
- De Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1987).** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* **169**, 2624-2630.
- De Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1988a).** Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J Mol Biol* **203**, 875-884.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F. & Neilands, J. B. (1988b).** Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**, 537-546.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001).** The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**, 1297-1309.
- Delany, I., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2004).** Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **52**, 1081-1090.
- den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K. & Buttner, M. J. (2010).** Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **78**, 361-379.
- Dian, C., Vitale, S., Leonard, G. A. & other authors (2011).** The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol* **79**, 1260-1275.
- Diaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D. & Johnston, A. W. (2004).** The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* **150**, 1447-1456.
- Dubrac, S. & Touati, D. (2000).** Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**, 3802-3808.
- Ducey, T. F., Carson, M. B., Orvis, J., Stintzi, A. P. & Dyer, D. W. (2005).** Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* **187**, 4865-4874.

- Duggan, J. & Gassman, M. (1974).** Induction of porphyrin synthesis in etiolated bean leaves by chelators of iron. *Plant Physiol* **53**, 206-215.
- Ehira, S., Ohmori, M. & Sato, N. (2005).** Identification of Low-temperature-regulated ORFs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: distinguishing the effects of low temperature from the effects of photosystem II excitation pressure. *Plant Cell Physiol* **46**, 1237-1245.
- Ehira, S. & Ohmori, M. (2006a).** NrrA directly regulates expression of *hetR* during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **188**, 8520-8525.
- Ehira, S. & Ohmori, M. (2006b).** NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Microbiol* **59**, 1692-1703.
- Eitinger, T. (2004).** In vivo production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *J Bacteriol* **186**, 7821-7825.
- Ekman, M., Tollback, P., Klint, J. & Bergman, B. (2006).** Protein expression profiles in an endosymbiotic cyanobacterium revealed by a proteomic approach. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1251-1261.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1988).** Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**, 747-754.
- Elhai, J. & Wolk, C. P. (1990).** Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J* **9**, 3379-3388.
- Elhai, J. (1993).** Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 179-184.
- Elhai, J., Vepritskiy, A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E. & Wolk, C. P. (1997).** Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **179**, 1998-2005.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008).** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476-486.
- Engels, V., Lindner, S. N. & Wendisch, V. F. (2008).** The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **190**, 8033-8044.
- Ernst, A., Black, T., Cai, Y., Panoff, J. M., Tiwari, D. N. & Wolk, C. P. (1992).** Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J Bacteriol* **174**, 6025-6032.

- Ernst, F. D., Homuth, G., Stoof, J. & other authors (2005).** Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol* **187**, 3687-3692.
- Ernst, J. F., Bennett, R. L. & Rothfield, L. I. (1978).** Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **135**, 928-934.
- Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1998).** Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**, 537-547.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223-6229.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (2000).** Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 24709-24714.
- Fan, Q., Huang, G., Lechno-Yossef, S., Wolk, C. P., Kaneko, T. & Tabata, S. (2005).** Clustered genes required for synthesis and deposition of envelope glycolipids in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Microbiol* **58**, 227-243.
- Ferreira, F. & Strauss, N. A. (1994).** Iron deprivation in cyanobacteria. *J Appl Phycol* **6**, 199-210.
- Fiedler, G., Arnold, M., Hannus, S. & Maldener, I. (1998).** The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Microbiol* **27**, 1193-1202.
- Fiedler, G., Muro-Pastor, A. M., Flores, E. & Maldener, I. (2001).** NtcA-dependent expression of the *devBCA* operon, encoding a heterocyst-specific ATP-binding cassette transporter in *Anabaena* spp. *J Bacteriol* **183**, 3795-3799.
- Flaherty, B. L., Van Nieuwerburgh, F., Head, S. R. & Golden, J. W. (2011).** Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. *BMC Genomics* **12**, 332.
- Flores, E. & Herrero, A. (2008).** *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Flores, E. & Herrero, A. (2010).** Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**, 39-50.
- Franceschini, S., Ceci, P., Alaleona, F., Chiancone, E. & Ilari, A. (2006).** Antioxidant Dps protein from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *FEBS J* **273**, 4913-4928.

- Frechon, D. & Le Cam, E. (1994).** Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 346-355.
- Frias, J. E., Flores, E. & Herrero, A. (1994).** Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **14**, 823-832.
- Friedman, D. B., Stauff, D. L., Pishchany, G., Whitwell, C. W., Torres, V. J. & Skaar, E. P. (2006).** *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog* **2**, e87.
- Fujimori, T., Higuchi, M., Sato, H., Aiba, H., Muramatsu, M., Hihara, Y. & Sonoike, K. (2005).** The mutant of *sll1961*, which encodes a putative transcriptional regulator, has a defect in regulation of photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **139**, 408-416.
- Funari, E. & Testai, E. (2008).** Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* **38**, 97-125.
- Gao, H., Zhou, D., Li, Y. & other authors (2008).** The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **190**, 3063-3075.
- Gehrig, H., Schussler, A. & Kluge, M. (1996).** *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J Mol Evol* **43**, 71-81.
- Geider, R. J. & La Roche, J. (1994).** The role of iron in phytoplankton photosynthesis and the potential for iron limitation of primary productivity in the sea. *Photosynth Res* **39**, 275-301.
- Ghassemian, M. & Straus, N. A. (1996).** Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **142 (Pt 6)**, 1469-1476.
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R. & Andrinolo, D. (2011).** An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs* **9**, 2164-2175.
- Glazer, A. N. (1976).** Phycocyanins. In: *Photochemical and photobiological reviews*, pp. 71-115. Edited by K. C. Smith. New York: Plenum Press.
- Golden, J. W., Whorff, L. L. & Wiest, D. R. (1991).** Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **173**, 7098-7105.
- Golden, J. W. & Yoon, H. S. (2003).** Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 557-563.

- Goldman, S. J., Lammers, P. J., Berman, M. S. & Sanders-Loehr, J. (1983).** Siderophore-mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp. *J Bacteriol* **156**, 1144-1150.
- González, A., Bes, M. T., Barja, F., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2010).** 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**, 1900-1914.
- González, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2011).** Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis. *J Proteomics* **74**, 660-671.
- González, A., Bes, M. T., Valladares, A., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (In press).** FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120 *Environ Microbiol*.
- González, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (In revision).** FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol*.
- González de Peredo, A., Saint-Pierre, C., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. & Forest, E. (2001).** Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* **310**, 83-91.
- Griese, M., Lange, C. & Soppa, J. (2011).** Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **323**, 124-131.
- Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. & Genco, C. A. (2003).** Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9542-9547.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. & Collier, J. L. (1993).** The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**, 725-749.
- Guikema, J. A. & Sherman, L. A. (1983).** Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation. *Plant Physiol* **73**, 250-256.
- Hall, H. K. & Foster, J. W. (1996).** The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**, 5683-5691.
- Hantke, K. (1984).** Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **197**, 337-341.
- Hantke, K. (2001).** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-177.
- Hantke, K. (2005).** Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* **8**, 196-202.

- Haselkorn, R. (2008).** Cell-cell communication in filamentous cyanobacteria. *Mol Microbiol* **70**, 783-785.
- Hassett, D. J., Sokol, P. A., Howell, M. L., Ma, J. F., Schweizer, H. T., Ochsner, U. & Vasil, M. L. (1996).** Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* **178**, 3996-4003.
- Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yeremenko, N., Matthijs, H. C. & Jeanjean, R. (2005).** The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. *FEBS Lett* **579**, 2289-2293.
- Havens, K. E., James, R. T., East, T. L. & Smith, V. H. (2003).** N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environ Pollut* **122**, 379-390.
- Havens, K. E. (2008).** Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Adv Exp Med Biol* **619**, 733-747.
- He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O. & Grossman, A. R. (2001).** The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. Expression and function in high light. *J Biol Chem* **276**, 306-314.
- Hebbar, P. B. & Curtis, S. E. (2000).** Characterization of *devH*, a gene encoding a putative DNA binding protein required for heterocyst function in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **182**, 3572-3581.
- Heidrich, C., Hantke, K., Bierbaum, G. & Sahl, H. G. (1996).** Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **140**, 253-259.
- Heinemann, I. U., Jahn, M. & Jahn, D. (2008).** The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **474**, 238-251.
- Hellman, L. M. & Fried, M. G. (2007).** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-1861.
- Henson, B. J., Pennington, L. E., Watson, L. E. & Barnum, S. R. (2008).** Excision of the *nifD* element in the heterocystous cyanobacteria. *Arch Microbiol* **189**, 357-366.
- Herbig, A. F. & Helmann, J. D. (2001).** Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol* **41**, 849-859.
- Hernández, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Neira, J. L. & Peleato, M. L. (2002).** Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem J* **366**, 315-322.

Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Bes, M. T., Fillat, M. F. & Peleato, M. L. (2004a). Three *fur* homologues from *Anabaena* sp. PCC 7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett* **236**, 275-282.

Hernández, J. A., Peleato, M. L., Fillat, M. F. & Bes, M. T. (2004b). Haem binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett* **577**, 35-41.

Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2006a). Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters. *Biometals* **19**, 259-268.

Hernández, J. A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2006b). Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol* **355**, 325-334.

Hernández, J. A., Pellicer, S., Huang, L., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2007). FurA modulates gene expression of *alr3808*, a DpsA homologue in *Nostoc (Anabaena)* sp. PCC7120. *FEBS Lett* **581**, 1351-1356.

Hernández, J. A., Alonso, I., Pellicer, S., Luisa Peleato, M., Cases, R., Strasser, R. J., Barja, F. & Fillat, M. F. (2009). Mutants of *Anabaena* sp. PCC 7120 lacking *alr1690* and alpha-*furA* antisense RNA show a pleiotropic phenotype and altered photosynthetic machinery. *J Plant Physiol* **167**, 430-437.

Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**, 411-425.

Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., Valladares, A. & Flores, E. (2004). Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 469-487.

Hider, R. C. & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**, 637-657.

Higo, A., Suzuki, T., Ikeuchi, M. & Ohmori, M. (2007). Dynamic transcriptional changes in response to rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* **153**, 3685-3694.

Hihara, Y., Sonoike, K., Kanehisa, M. & Ikeuchi, M. (2003). DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **185**, 1719-1725.

Holland, H. D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* **361**, 903-915.

Hong, S. K., Cha, M. K. & Kim, I. H. (2008). A glutaredoxin-fused thiol peroxidase acts as an important player in hydrogen peroxide detoxification in late-phased growth of *Anabaena* sp. PCC7120. *Arch Biochem Biophys* **475**, 42-49.

- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. & Foster, S. J. (2001).** PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**, 3744-3754.
- Hu, B., Yang, G., Zhao, W., Zhang, Y. & Zhao, J. (2007).** MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **63**, 1640-1652.
- Huang, D. L., Tang, D. J., Liao, Q. & other authors (2008).** The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Res* **36**, 4295-4309.
- Huang, F., Hedman, E., Funk, C., Kieselbach, T., Schroder, W. P. & Norling, B. (2004a).** Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Mol Cell Proteomics* **3**, 586-595.
- Huang, G., Fan, Q., Lechno-Yossef, S., Wojciuch, E., Wolk, C. P., Kaneko, T. & Tabata, S. (2005).** Clustered genes required for the synthesis of heterocyst envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **187**, 1114-1123.
- Huang, X. & Miller, W. (1991).** A time-efficient, linear-space local similarity algorithm *Adv Appl Math* **12**, 337-357.
- Huang, X., Dong, Y. & Zhao, J. (2004b).** HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4848-4853.
- Imashimizu, M., Yoshimura, H., Katoh, H., Ehira, S. & Ohmori, M. (2005).** NaCl enhances cellular cAMP and upregulates genes related to heterocyst development in the cyanobacterium, *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 97-103.
- Imlay, J. A. (2003).** Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**, 395-418.
- Jackson, L. A., Ducey, T. F., Day, M. W., Zaitshik, J. B., Orvis, J. & Dyer, D. W. (2010).** Transcriptional and functional analysis of the *Neisseria gonorrhoeae* Fur regulon. *J Bacteriol* **192**, 77-85.
- Jacobsen, I., Gerstenberger, J., Gruber, A. D., Bosse, J. T., Langford, P. R., Hennig-Pauka, I., Meens, J. & Gerlach, G. F. (2005).** Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **73**, 3740-3744.
- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1998).** X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 2564-2571.
- Jeanjean, R., Talla, E., Latifi, A., Havaux, M., Janicki, A. & Zhang, C. C. (2008).** A large gene cluster encoding peptide synthetases and polyketide synthases is involved in

production of siderophores and oxidative stress response in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Environ Microbiol* **10**, 2574-2585.

Jiang, F., Hellman, U., Sroga, G. E., Bergman, B. & Mannervik, B. (1995). Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J Biol Chem* **270**, 22882-22889.

Johnston, A. W., Todd, J. D., Curson, A. R., Lei, S., Nikolaidou-Katsaridou, N., Gelfand, M. S. & Rodionov, D. A. (2007). Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other alpha-proteobacteria. *Biometals* **20**, 501-511.

Jungblut, A. D., Lovejoy, C. & Vincent, W. F. (2010). Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. *ISME J* **4**, 191-202.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H. & other authors (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**, 109-136.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P. & other authors (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**, 205-213; 227-253.

Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A. R. & Ogawa, T. (2001). Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**, 2779-2784.

Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* **365**, 729-748.

Keren, N., Aurora, R. & Pakrasi, H. B. (2004). Critical roles of bacterioferritins in iron storage and proliferation of cyanobacteria. *Plant Physiol* **135**, 1666-1673.

Khudyakov, I. & Wolk, C. P. (1996). Evidence that the *hanA* gene coding for HU protein is essential for heterocyst differentiation in, and cyanophage A-4(L) sensitivity of, *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **178**, 3572-3577.

Khudyakov, I. & Wolk, C. P. (1997). *hetC*, a gene coding for a protein similar to bacterial ABC protein exporters, is involved in early regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **179**, 6971-6978.

Kilian, O., Steunou, A. S., Fazeli, F., Bailey, S., Bhaya, D. & Grossman, A. R. (2007). Responses of a thermophilic *Synechococcus* isolate from the microbial mat of Octopus Spring to light. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4268-4278.

Kim, K. S., Chang, Y. J., Chung, Y. J., Park, C. U. & Seo, H. Y. (2007). Enhanced expression of high-affinity iron transporters via H-ferritin production in yeast. *J Biochem Mol Biol* **40**, 82-87.

Kirilovsky, D. (2007). Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth Res* **93**, 7-16.

Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B. & Ikeuchi, M. (2004). Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **45**, 290-299.

Koharyova, M. & Kolarova, M. (2008). Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys* **27**, 71-84.

Koksharova, O. A. & Wolk, C. P. (2002a). Genetic tools for cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 123-137.

Koksharova, O. A. & Wolk, C. P. (2002b). Novel DNA-binding proteins in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **184**, 3931-3940.

Koksharova, O. A., Klint, J. & Rasmussen, U. (2007). Comparative proteomics of cell division mutants and wild-type of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **153**, 2505-2517.

Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1781-1804.

Kumar, K., Mella-Herrera, R. A. & Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Persp Biol* **2**, a000315.

Kupper, H., Setlik, I., Seibert, S. & other authors (2008). Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New Phytol* **179**, 784-798.

Kustka, A., Carpenter, E. J. & Sanudo-Wilhelmy, S. A. (2002). Iron and marine nitrogen fixation: progress and future directions. *Res Microbiol* **153**, 255-262.

Lam, M. S., Litwin, C. M., Carroll, P. A. & Calderwood, S. B. (1994). *Vibrio cholerae* fur mutations associated with loss of repressor activity: implications for the structural-functional relationships of fur. *J Bacteriol* **176**, 5108-5115.

Lammers, P. J. & Sanders-Loehr, J. (1982). Active transport of ferric schizokinen in *Anabaena* sp. *J Bacteriol* **151**, 288-294.

Latifi, A., Jeanjean, R., Lemeille, S., Havaux, M. & Zhang, C. C. (2005). Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **187**, 6596-6598.

Latifi, A., Ruiz, M., Jeanjean, R. & Zhang, C. C. (2007). PrxQ-A, a member of the peroxiredoxin Q family, plays a major role in defense against oxidative stress in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Free Radic Biol Med* **42**, 424-431.

- Latifi, A., Ruiz, M. & Zhang, C. C. (2009).** Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 258-278.
- Lavrrar, J. L., Christoffersen, C. A. & McIntosh, M. A. (2002).** Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**, 983-995.
- Lavrrar, J. L. & McIntosh, M. A. (2003).** Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**, 2194-2202.
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2010).** Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci* **19**, 1137-1161.
- Le Cam, E., Frechon, D., Barray, M., Fourcade, A. & Delain, E. (1994).** Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11816-11820.
- Lee, H. W., Choe, Y. H., Kim, D. K., Jung, S. Y. & Lee, N. G. (2004).** Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* **4**, 2014-2027.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006a).** The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**, 363-367.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006b).** Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the Bacillus subtilis peroxide sensor PerR. *J Biol Chem* **281**, 23567-23578.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485-499.
- Lee, M. H., Scherer, M., Rigali, S. & Golden, J. W. (2003).** PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **185**, 4315-4325.
- Lelong, C., Rolland, M., Louwagie, M., Garin, J. & Geiselmann, J. (2007).** Mutual regulation of Crl and Fur in *Escherichia coli* W3110. *Mol Cell Proteomics* **6**, 660-668.
- Lewin, A. C., Doughty, P. A., Flegg, L., Moore, G. R. & Spiro, S. (2002).** The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology* **148**, 2449-2456.
- Li, B., Huang, X. & Zhao, J. (2002a).** Expression of *hetN* during heterocyst differentiation and its inhibition of *hetR* up-regulation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett* **517**, 87-91.
- Li, H. & Sherman, L. A. (2000).** A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **182**, 4268-4277.

- Li, H., Singh, A. K., McIntyre, L. M. & Sherman, L. A. (2004).** Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **186**, 3331-3345.
- Li, J. H., Laurent, S., Konde, V., Bedu, S. & Zhang, C. C. (2003).** An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* **149**, 3257-3263.
- Li, T., Huang, X., Zhou, R., Liu, Y., Li, B., Nomura, C. & Zhao, J. (2002b).** Differential expression and localization of Mn and Fe superoxide dismutases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **184**, 5096-5103.
- Liang, J., Scappino, L. & Haselkorn, R. (1992).** The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5655-5659.
- Lindahl, M. & Florencio, F. J. (2003).** Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 16107-16112.
- Liu, D. & Golden, J. W. (2002).** *hetL* overexpression stimulates heterocyst formation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **184**, 6873-6881.
- Long, B. M., Tucker, L., Badger, M. R. & Price, G. D. (2010).** Functional cyanobacterial beta-carboxysomes have an absolute requirement for both long and short forms of the CcmM protein. *Plant Physiol* **153**, 285-293.
- López-Gomollón, S., Hernández, J. A., Pellicer, S., Angarica, V. E., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2007a).** 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* **374**, 267-281.
- López-Gomollón, S., Hernández, J. A., Wolk, C. P., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2007b).** Expression of *furA* is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* **153**, 42-50.
- López-Gomollón, S., Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2009).** New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J* **418**, 201-207.
- López-Igual, R., Lechno-Yossef, S., Fan, Q., Herrero, A., Flores, E. & Wolk, C. P. (2012).** A major facilitator superfamily protein, HepP, is involved in formation of the heterocyst envelope polysaccharide in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **194**, 4677-4687.
- Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. & Pohl, E. (2007).** Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**, 9914-9922.

- Lloyd, G., Landini, P. & Busby, S. (2001). Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem* **37**, 17-31.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G. M. & other authors (2007). Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* **189**, 730-740.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2003). *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education.
- Malbrouck, C. & Kestemont, P. (2006). Effects of microcystins on fish. *Environ Toxicol Chem* **25**, 72-86.
- Mann, N. H. (2003). Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 17-34.
- Marie, B., Huet, H., Marie, A., Djediat, C., Puiseux-Dao, S., Catherine, A., Trinchet, I. & Edery, M. (2012). Effects of a toxic cyanobacterial bloom (*Planktothrix agardhii*) on fish: insights from histopathological and quantitative proteomic assessments following the oral exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* **114-115**, 39-48.
- Mariscal, V., Herrero, A. & Flores, E. (2007). Continuous periplasm in a filamentous, heterocyst-forming cyanobacterium. *Mol Microbiol* **65**, 1139-1145.
- Marr, A. K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Muller-Altrock, S. & Goebel, W. (2006). Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol* **188**, 3887-3901.
- Martin-Luna, B., Hernández, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F. & Peleato, M. L. (2006a). Identification of a ferric uptake regulator from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 63-70.
- Martin-Luna, B., Sevilla, E., Hernandez, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F. & Peleato, M. L. (2006b). Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry* **67**, 876-881.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4620-4625.
- Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G. & Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* **10**, 140-145.
- McHugh, J. P., Rodríguez-Quñones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. & Andrews, S. C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 29478-29486.
- Meeks, J. C., Campbell, E. L., Summers, M. L. & Wong, F. C. (2002). Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol* **178**, 395-403.

- Mellin, J. R., Goswami, S., Grogan, S., Tjaden, B. & Genco, C. A. (2007).** A novel Fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect Fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **189**, 3686-3694.
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Kanukurthy, V., Fisher, C. R. & Payne, S. M. (2005).** Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of fur in virulence. *Infect Immun* **73**, 8167-8178.
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B. B., Cejudo, F. J. & Geigenberger, P. (2009).** NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 9908-9913.
- Michel, K. P., Thole, H. H. & Pistorius, E. K. (1996).** IdiA, a 34 kDa protein in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strains PCC 6301 and PCC 7942, is required for growth under iron and manganese limitations. *Microbiology* **142 (Pt 9)**, 2635-2645.
- Michel, K. P. & Pistorius, E. K. (2004).** Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA. *Physiol Plant* **120**, 36-50.
- Mills, M. M., Ridame, C., Davey, M., La Roche, J. & Geider, R. J. (2004).** Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. *Nature* **429**, 292-294.
- Mirus, O., Strauss, S., Nicolaisen, K., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2009).** TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biol* **7**, 68.
- Mishra, Y., Chaurasia, N. & Rai, L. C. (2009).** AhpC (alkyl hydroperoxide reductase) from *Anabaena* sp. PCC 7120 protects *Escherichia coli* from multiple abiotic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* **381**, 606-611.
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W. R. & Muro-Pastor, A. M. (2011).** Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 20130-20135.
- Morel, F. M. & Price, N. M. (2003).** The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science* **300**, 944-947.
- Moser, D. P., Zarka, D. & Kallas, T. (1993).** Characterization of a restriction barrier and electrotransformation of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7121. *Arch Microbiol* **160**, 229-237.
- Moslavac, S., Bredemeier, R., Mirus, O., Granvogel, B., Eichacker, L. A. & Schleiff, E. (2005).** Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Proteome Res* **4**, 1330-1338.
- Moslavac, S., Nicolaisen, K., Mirus, O., Al Dehni, F., Pernil, R., Flores, E., Maldener, I. & Schleiff, E. (2007a).** A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **189**, 7887-7895.

- Moslavac, S., Reisinger, V., Berg, M., Mirus, O., Vosyka, O., Ploscher, M., Flores, E., Eichacker, L. A. & Schleiff, E. (2007b). The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biol Chem* **388**, 823-829.
- Muhlenhoff, U. & Chauvat, F. (1996). Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Mol Gen Genet* **252**, 93-100.
- Mulligan, M. E. & Haselkorn, R. (1989). Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB-fdxN-nifS-nifU* operon. *J Biol Chem* **264**, 19200-19207.
- Munch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. & Jahn, D. (2003). PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* **31**, 266-269.
- Munch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**, 4187-4189.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (1999). The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobacterial heterocyst development. *J Bacteriol* **181**, 6664-6669.
- Muro-Pastor, A. M., Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (2002). Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development. *Mol Microbiol* **44**, 1377-1385.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J Biol Chem* **276**, 38320-38328.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* **83**, 135-150.
- Napolitano, M., Rubio, M. A., Santamaria-Gomez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N. J. & Luque, I. (2012). Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **194**, 2426-2436.
- Narayan, O. P., Kumari, N. & Rai, L. C. (2011). Iron starvation-induced proteomic changes in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: exploring survival strategy. *J Microbiol Biotechnol* **21**, 136-146.
- Nayar, A. S., Yamaura, H., Rajagopalan, R., Risser, D. D. & Callahan, S. M. (2007). FraG is necessary for filament integrity and heterocyst maturation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Microbiology* **153**, 601-607.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.

- Nicolaisen, K., Moslavac, S., Samborski, A., Valdebenito, M., Hantke, K., Maldener, I., Muro-Pastor, A. M., Flores, E. & Schleiff, E. (2008).** Alr0397 is an outer membrane transporter for the siderophore schizokinen in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **190**, 7500-7507.
- Nicolaisen, K., Hahn, A. & Schleiff, E. (2009).** The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Basic Microbiol* **49**, 5-24.
- Nicolaisen, K., Hahn, A., Valdebenito, M. & other authors (2010).** The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 2131-2140.
- Nodop, A., Pietsch, D., Hocker, R., Becker, A., Pistorius, E. K., Forchhammer, K. & Michel, K. P. (2008).** Transcript profiling reveals new insights into the acclimation of the mesophilic fresh-water cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to iron starvation. *Plant Physiol* **147**, 747-763.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. & Buchanan, S. K. (2010).** TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**, 43-60.
- Ochsner, U. A. & Vasil, M. L. (1996).** Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4409-4414.
- Ogola, H. J., Kamiike, T., Hashimoto, N., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H. & Sawa, Y. (2009).** Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7509-7518.
- Ohashi, S., Miyashita, H., Okada, N., Iemura, T., Watanabe, T. & Kobayashi, M. (2008).** Unique photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynth Res* **98**, 141-149.
- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. & Murata, N. (2005).** Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* **44**, 8494-8499.
- Olmedo-Verd, E., Flores, E., Herrero, A. & Muro-Pastor, A. M. (2005).** HetR-dependent and -independent expression of heterocyst-related genes in an *Anabaena* strain overproducing the NtcA transcription factor. *J Bacteriol* **187**, 1985-1991.
- Omoregie, E. O., Crumbliss, L. L., Bebout, B. M. & Zehr, J. P. (2004).** Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* dominated microbial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 305-308.
- Orozco, C. C., Risser, D. D. & Callahan, S. M. (2006).** Epistasis analysis of four genes from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 suggests a connection between PatA and PatS in heterocyst pattern formation. *J Bacteriol* **188**, 1808-1816.

- Ortiz de Orué Lucana, D. & Schrempf, H. (2000).** The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* **264**, 341-353.
- Osterberg, M., Kim, H., Warringer, J., Melen, K., Blomberg, A. & von Heijne, G. (2006).** Phenotypic effects of membrane protein overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 11148-11153.
- Ow, S. Y., Cardona, T., Taton, A., Magnuson, A., Lindblad, P., Stensjo, K. & Wright, P. C. (2008).** Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from *Nostoc* sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. *J Proteome Res* **7**, 1615-1628.
- Paerl, H. (2008).** Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. *Adv Exp Med Biol* **619**, 217-237.
- Pandhal, J., Wright, P. C. & Biggs, C. A. (2007).** A quantitative proteomic analysis of light adaptation in a globally significant marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *J Proteome Res* **6**, 996-1005.
- Park, S. Y., Kelminson, K. L., Lee, A. K., Zhang, P., Warner, R. E., Rehkopf, D. H., Calderwood, S. B. & Koehler, J. E. (2001).** Identification, characterization, and functional analysis of a gene encoding the ferric uptake regulation protein in *Bartonella* species. *J Bacteriol* **183**, 5751-5755.
- Park, Y. I., Sandstrom, S., Gustafsson, P. & Oquist, G. (1999).** Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation. *Mol Microbiol* **32**, 123-129.
- Partensky, F., Hess, W. R. & Vaultot, D. (1999).** *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 106-127.
- Pascual, M. B., Mata-Cabana, A., Florencio, F. J., Lindahl, M. & Cejudo, F. J. (2010).** Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress. *J Biol Chem* **285**, 34485-34492.
- Pascual, M. B., Mata-Cabana, A., Florencio, F. J., Lindahl, M. & Cejudo, F. J. (2011).** A comparative analysis of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system from plants and cyanobacteria. *Plant Physiol* **155**, 1806-1816.
- Paul, V. J. (2008).** Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *Adv Exp Med Biol* **619**, 239-257.
- Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. (2006).** Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* **281**, 21286-21295.

- Pellicer, S., Bes, M. T., González, A., Neira, J. L., Luisa Peleato, M. & Fillat, M. F. (2010).** High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment. *Proc Biochem* **45**, 292-296.
- Pellicer, S., González, A., Peleato, M. L., Martínez, J. I., Fillat, M. F. & Bes, M. T. (2012).** Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *FEBS J* **279**, 2231-2246.
- Peña, M. M. & Bullerjahn, G. S. (1995).** The DpsA protein of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is a DNA-binding hemoprotein. Linkage of the Dps and bacterioferritin protein families. *J Biol Chem* **270**, 22478-22482.
- Pérez-Pérez, M. E., Mata-Cabana, A., Sanchez-Riego, A. M., Lindahl, M. & Florencio, F. J. (2009).** A comprehensive analysis of the peroxiredoxin reduction system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 reveals that all five peroxiredoxins are thioredoxin dependent. *J Bacteriol* **191**, 7477-7489.
- Perez-Ruiz, J. M., Spinola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. & Cejudo, F. J. (2006).** Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**, 2356-2368.
- Pernil, R., Picossi, S., Mariscal, V., Herrero, A. & Flores, E. (2008).** ABC-type amino acid uptake transporters Bgt and N-II of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 share an ATPase subunit and are expressed in vegetative cells and heterocysts. *Mol Microbiol* **67**, 1067-1080.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pich, O. Q., Carpenter, B. M., Gilbreath, J. J. & Merrell, D. S. (2012).** Detailed analysis of *Helicobacter pylori* Fur-regulated promoters reveals a Fur box core sequence and novel Fur-regulated genes. *Mol Microbiol* **84**, 921-941.
- Pietsch, D., Staiger, D., Pistorius, E. K. & Michel, K. P. (2007).** Characterization of the putative iron sulfur protein IdiC (ORF5) in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Photosynth Res* **94**, 91-108.
- Pisareva, T., Shumskaya, M., Maddalo, G., Ilag, L. & Norling, B. (2007).** Proteomics of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Identification of novel integral plasma membrane proteins. *FEBS J* **274**, 791-804.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003).** Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**, 903-915.
- Pointing, S. B., Chan, Y., Lacap, D. C., Lau, M. C., Jurgens, J. A. & Farrell, R. L. (2009).** Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 19964-19969.

- Posey, J. E. & Gherardini, F. C. (2000). Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**, 1651-1653.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2002). *Microbiology*, 5th edn. Boston: McGraw-Hill.
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**, 15661-15667.
- Qi, Z. & O'Brian, M. R. (2002). Interaction between the bacterial iron response regulator and ferrochelatase mediates genetic control of heme biosynthesis. *Mol Cell* **9**, 155-162.
- Qin, B., Zhu, G., Gao, G., Zhang, Y., Li, W., Paerl, H. W. & Carmichael, W. W. (2010). A drinking water crisis in Lake Taihu, China: linkage to climatic variability and lake management. *Environ Manage* **45**, 105-112.
- Quatrini, R., Lefimil, C., Veloso, F. A., Pedroso, I., Holmes, D. S. & Jedlicki, E. (2007). Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic Acids Res* **35**, 2153-2166.
- Raines, C. A. & Lloyd, J.C. (2007). C3 carbon reduction cycle. *Encyclopedia of Life Sciences* DOI: 10.1002/9780470015902.a0001314.pub2. www.els.net.
- Ramaswamy, K. S., Carrasco, C. D., Fatma, T. & Golden, J. W. (1997). Cell-type specificity of the *Anabaena fdxN*-element rearrangement requires *xisH* and *xisI*. *Mol Microbiol* **23**, 1241-1249.
- Ramirez, M. E., Hebbar, P. B., Zhou, R., Wolk, C. P. & Curtis, S. E. (2005). *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene *devH* is required for synthesis of the heterocyst glycolipid layer. *J Bacteriol* **187**, 2326-2331.
- Ran, L., Huang, F., Ekman, M., Klint, J. & Bergman, B. (2007). Proteomic analyses of the photoauto- and diazotrophically grown cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Microbiology* **153**, 608-618.
- Razquin, P., Schmitz, S., Fillat, M. F., Peleato, M. L. & Bohme, H. (1994). Transcriptional and translational analysis of ferredoxin and flavodoxin under iron and nitrogen stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **176**, 7409-7411.
- Repine, J. E., Fox, R. B. & Berger, E. M. (1981). Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J Biol Chem* **256**, 7094-7096.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria*. *J Gen Microbiol* **111**, 1-61.
- Risser, D. D. & Callahan, S. M. (2008). HetF and PatA control levels of HetR in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **190**, 7645-7654.

- Rudolph, G., Hennecke, H. & Fischer, H. M. (2006).** Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 631-648.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. & Bestervelt, L. L. (In press).** Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*.
- Saha, S. K. & Golden, J. W. (2011).** Overexpression of *pknE* blocks heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **193**, 2619-2629.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandh, G., Xu, L. & Bergman, B. (2012).** Diazocyte development in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Microbiology* **158**, 345-352.
- Sandstrom, S., Park, Y. I., Oquist, G. & Gustafsson, P. (2001).** CP43', the *isiA* gene product, functions as an excitation energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochem Photobiol* **74**, 431-437.
- Sato, N., Ohmori, M., Ikeuchi, M. & other authors (2004).** Use of segment-based microarray in the analysis of global gene expression in response to various environmental stresses in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Gen Appl Microbiol* **50**, 1-8.
- Saxena, R. K., Raghuvanshi, R., Singh, S. & Bisen, P. S. (2006).** Iron induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Indian J Exp Biol* **44**, 849-851.
- Schaffer, S., Hantke, K. & Braun, V. (1985).** Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol Gen Genet* **200**, 110-113.
- Schmetterer, G. (1994).** Cyanobacterial respiration. In: *The molecular biology of Cyanobacteria*, pp. 409-435. Edited by D. A. Bryant. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Schobert, M. & Jahn, D. (2002).** Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 287-294.
- Sebastian, S., Agarwal, S., Murphy, J. R. & Genco, C. A. (2002).** The gonococcal *fur* regulon: identification of additional genes involved in major catabolic, recombination, and secretory pathways. *J Bacteriol* **184**, 3965-3974.
- Seino, Y., Takahashi, T. & Hihara, Y. (2009).** The response regulator RpaB binds to the upstream element of photosystem I genes to work for positive regulation under low-light conditions in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **191**, 1581-1586.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., González, A., Gonzalo-Asensio, J. A., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2011).** Identification of three novel antisense RNAs in the *fur* locus from unicellular cyanobacteria. *Microbiology* **157**, 3398-3404.

- Shcolnick, S. & Keren, N. (2006).** Metal homeostasis in cyanobacteria and chloroplasts. Balancing benefits and risks to the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol* **141**, 805-810.
- Shcolnick, S., Shaked, Y. & Keren, N. (2007).** A role for mrgA, a DPS family protein, in the internal transport of Fe in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 814-819.
- Shcolnick, S., Summerfield, T. C., Reytman, L., Sherman, L. A. & Keren, N. (2009).** The mechanism of iron homeostasis in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its relationship to oxidative stress. *Plant Physiol* **150**, 2045-2056.
- Sheikh, M. A. & Taylor, G. L. (2009).** Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol Microbiol* **72**, 1208-1220.
- Sherman, D. M. & Sherman, L. A. (1983).** Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* **156**, 393-401.
- Shevchenko, A. & Shevchenko, A. (2001).** Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* **296**, 279-283.
- Shi, T., Sun, Y. & Falkowski, P. G. (2007).** Effects of iron limitation on the expression of metabolic genes in the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *Environ Microbiol* **9**, 2945-2956.
- Shi, Y., Zhao, W., Zhang, W., Ye, Z. & Zhao, J. (2006).** Regulation of intracellular free calcium concentration during heterocyst differentiation by HetR and NtcA in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 11334-11339.
- Shin, J. H., Oh, S. Y., Kim, S. J. & Roe, J. H. (2007).** The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **189**, 4070-4077.
- Singh, A. K. & Sherman, L. A. (2000).** Identification of iron-responsive, differential gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 with a customized amplification library. *J Bacteriol* **182**, 3536-3543.
- Singh, A. K., McIntyre, L. M. & Sherman, L. A. (2003).** Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **132**, 1825-1839.
- Small, S. K., Puri, S. & O'Brian, M. R. (2009).** Heme-dependent metalloregulation by the iron response regulator (Irr) protein in *Rhizobium* and other Alpha-proteobacteria. *Biomaterials* **22**, 89-97.
- Smith, A., Hooper, N. I., Shipulina, N. & Morgan, W. T. (1996).** Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (fur) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* **15**, 575-583.

- Smith, K. F., Bibb, L. A., Schmitt, M. P. & Oram, D. M. (2009).** Regulation and activity of a zinc uptake regulator, Zur, in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **191**, 1595-1603.
- Sohm, J. A., Webb, E. A. & Capone, D. G. (2011).** Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **9**, 499-508.
- Spinola, M. C., Perez-Ruiz, J. M., Pulido, P., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Gonzalez, M. & Cejudo, F. J. (2008).** NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol Plant* **133**, 516-524.
- Srivastava, R., Pisareva, T. & Norling, B. (2005).** Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **5**, 4905-4916.
- Staggs, T. M., Fetherston, J. D. & Perry, R. D. (1994).** Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. *J Bacteriol* **176**, 7614-7624.
- Stal, L. J. & Moezelaar, R. (1997).** Fermentation in *Cyanobacteria*. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 179-211.
- Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. (1977).** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**, 225-274.
- Stein, J. R. (1973).** *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. New York: Cambridge University Press.
- Stensjo, K., Ow, S. Y., Barrios-Llerena, M. E., Lindblad, P. & Wright, P. C. (2007).** An iTRAQ-based quantitative analysis to elaborate the proteomic response of *Nostoc* sp. PCC 7120 under N₂ fixing conditions. *J Proteome Res* **6**, 621-635.
- Stevanovic, M., Hahn, A., Nicolaisen, K., Mirus, O. & Schleiff, E. (2012).** The components of the putative iron transport system in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol* **14**, 1655-1670.
- Stewart, I., Seawright, A. A. & Shaw, G. R. (2008).** Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds--an overview. *Adv Exp Med Biol* **619**, 613-637.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A. J. & Hantke, K. (1994).** Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *J Mol Biol* **236**, 531-545.
- Stojiljkovic, I. & Hantke, K. (1995).** Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**, 199-205.
- Street, J. H. & Paytan, A. (2005).** Iron, phytoplankton growth, and the carbon cycle. *Met Ions Biol Sys* **43**, 153-193.
- Sturms, R., DiSpirito, A. A., Fulton, D. B. & Hargrove, M. S. (2011).** Hydroxylamine reduction to ammonium by plant and cyanobacterial hemoglobins. *Biochemistry* **50**, 10829-10835.

- Taketani, S., Adachi, Y. & Nakahashi, Y. (2000).** Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels. *Eur J Biochem* **267**, 4685-4692.
- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J. & Wilmotte, A. (2006).** Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **57**, 272-289.
- Teixido, L., Cortes, P., Bigas, A., Alvarez, G., Barbe, J. & Campoy, S. (2010).** Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*. *Int Microbiol* **13**, 33-39.
- Theil, E. C. (1987).** Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* **56**, 289-315.
- Thiel, T. & Poo, H. (1989).** Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J Bacteriol* **171**, 5743-5746.
- Thomas, C. M. & Smith, C. A. (1987).** Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annu Rev Microbiol* **41**, 77-101.
- Thompson, D. K., Beliaev, A. S., Giometti, C. S. & other authors (2002).** Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (fur) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **68**, 881-892.
- Thurman, R. G., Ley, H. G. & Scholz, R. (1972).** Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem* **25**, 420-430.
- Ting, C. S., Rocap, G., King, J. & Chisholm, S. W. (2002).** Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends Microbiol* **10**, 134-142.
- Todd, J. D., Sawers, G., Rodionov, D. A. & Johnston, A. W. (2006).** The *Rhizobium leguminosarum* regulator IrrA affects the transcription of a wide range of genes in response to Fe availability. *Mol Genet Genomics* **275**, 564-577.
- Toepel, J., Welsh, E., Summerfield, T. C., Pakrasi, H. B. & Sherman, L. A. (2008).** Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth. *J Bacteriol* **190**, 3904-3913.
- Traoré, D. A., El Ghazouani, A., Ilango, S., Dupuy, J., Jacquamet, L., Ferrer, J. L., Caux-Thang, C., Duarte, V. & Latour, J. M. (2006).** Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **61**, 1211-1219.
- Traoré, D. A., El Ghazouani, A., Jacquamet, L. & other authors (2009).** Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein. *Nat Chem Biol* **5**, 53-59.

Tripathi, B. N., Bhatt, I. & Dietz, K. J. (2009). Peroxiredoxins: a less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma* **235**, 3-15.

Troxell, B., Fink, R. C., Porwollik, S., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2011). The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*: identification of new Fur targets. *BMC Microbiol* **11**, 236.

Tsolis, R. M., Baumler, A. J., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. (1995). Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* **177**, 4628-4637.

Valladares, A., Herrero, A., Pils, D., Schmetterer, G. & Flores, E. (2003). Cytochrome c oxidase genes required for nitrogenase activity and diazotrophic growth in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **47**, 1239-1249.

Valladares, A., Flores, E. & Herrero, A. (2008). Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **190**, 6126-6133.

van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. & Bakker, G. J. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* **51**, 7-60.

van de Meene, A. M., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F. & Roberson, R. W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **184**, 259-270.

Vargas-Montero, M. & Freer, E. (2004). Algal blooms of the toxigenic diatom *Pseudo-Nitzschia* (*Bacillariophyceae*) in the Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev Biol Trop* **52** (Suppl 1), 127-132.

Vasil, M. L. & Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**, 399-413.

Vassinova, N. & Kozyrev, D. (2000). A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146** (Pt 12), 3171-3182.

Vavilin, D. V. & Vermaas, W. F. (2002). Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol Plant* **115**, 9-24.

Vioque, A. (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* **20**, 6331-6337.

Vioque, A. (2007). Transformation of cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol* **616**, 12-22.

W.H.O. (2003). World Health Organization Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1 Coastal and fresh waters.

- Wan, X. F., Verberkmoes, N. C., McCue, L. A. & other authors (2004).** Transcriptomic and proteomic characterization of the Fur modulon in the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* **186**, 8385-8400.
- Wang, F., Cheng, S., Sun, K. & Sun, L. (2008).** Molecular analysis of the *fur* (ferric uptake regulator) gene of a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *J Microbiol* **46**, 350-355.
- Wang, T., Shen, G., Balasubramanian, R., McIntosh, L., Bryant, D. A. & Golbeck, J. H. (2004).** The *sufR* gene (*sll0088* in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the *sufBCDS* operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria. *J Bacteriol* **186**, 956-967.
- Wang, Y., Wu, S. L., Hancock, W. S., Trala, R., Kessler, M., Taylor, A. H., Patel, P. S. & Aon, J. C. (2005).** Proteomic profiling of *Escherichia coli* proteins under high cell density fed-batch cultivation with overexpression of phosphogluconolactonase. *Biotechnol Prog* **21**, 1401-1411.
- Wang, Y. & Xu, X. (2005).** Regulation by *hetC* of genes required for heterocyst differentiation and cell division in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **187**, 8489-8493.
- Wang, Y., Lechno-Yossef, S., Gong, Y., Fan, Q., Wolk, C. P. & Xu, X. (2007).** Predicted glycosyl transferase genes located outside the HEP island are required for formation of heterocyst envelope polysaccharide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **189**, 5372-5378.
- Watkins, S. M., Reich, A., Fleming, L. E. & Hammond, R. (2008).** Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar Drugs* **6**, 431-455.
- Watnick, P. I., Eto, T., Takahashi, H. & Calderwood, S. B. (1997).** Purification of *Vibrio cholerae* Fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* **179**, 243-247.
- Weinberg, E. D. (1997).** The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* **40**, 578-583.
- Wen-Liang, X., Yong-Ding, L. & Cheng-Cai, Z. (2003).** Effect of iron deficiency on heterocyst differentiation and physiology of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Wuhan Univ J Nat Sci* **8**, 880-884.
- Whitton, B. A. & Potts, M. (2000).** *The Ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. Boston: Kluwer Academic.
- Wilhelm, S. (1995).** Ecology of iron-limited cyanobacteria: a review of physiological responses and implications for aquatic systems. *Aquatic Microb Ecol* **9**, 295-303.
- Wilk, L., Strauss, M., Rudolf, M., Nicolaisen, K., Flores, E., Kuhlbrandt, W. & Schleiff, E. (2011).** Outer membrane continuity and septosome formation between vegetative cells in the filaments of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Cell Microbiol* **13**, 1744-1754.

- Willetts, N. & Wilkins, B. (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol Rev* **48**, 24-41.
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M. & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* **85**, 337-341.
- Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P. & Elhai, J. (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1561-1565.
- Wolk, C. P. (1996). Heterocyst formation. *Annu Rev Genet* **30**, 59-78.
- Wong, F. C. & Meeks, J. C. (2001). The *hetF* gene product is essential to heterocyst differentiation and affects HetR function in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *J Bacteriol* **183**, 2654-2661.
- Wu, X., Liu, D., Lee, M. H. & Golden, J. W. (2004). *patS* minigenes inhibit heterocyst development of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **186**, 6422-6429.
- Wu, X., Lee, D. W., Mella, R. A. & Golden, J. W. (2007). The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *asr1734* gene encodes a negative regulator of heterocyst development. *Mol Microbiol* **64**, 782-794.
- Xiaoqiang, W., Vennison, S. J., Huirong, L., Ben-Dov, E., Zaritsky, A. & Boussiba, S. (1997). Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4971-4974.
- Xu, X. & Wolk, C. P. (2001). Role for *hetC* in the transition to a nondividing state during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. *J Bacteriol* **183**, 393-396.
- Yang, J., Sangwan, I., Lindemann, A., Hauser, F., Hennecke, H., Fischer, H. M. & O'Brian, M. R. (2006). *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of heme to regulate iron homeostasis and metabolism. *Mol Microbiol* **60**, 427-437.
- Yang, Y., Harris, D. P., Luo, F., Wu, L., Parsons, A. B., Palumbo, A. V. & Zhou, J. (2008). Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: roles in iron and acid tolerance response. *BMC Genomics* **9 Suppl 1**, S11.
- Yoon, H. S. & Golden, J. W. (1998). Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science* **282**, 935-938.
- Yun, S., Shin, J. M., Kim, O. C., Jung, Y. R., Oh, D. B., Lee, S. Y. & Kwon, O. (2012). Probing the ArcA regulon in the rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens* by genome-wide expression profiling. *J Microbiol* **50**, 665-672.
- Zahalak, M., Beachy, R. N. & Thiel, T. (1995). Expression of the movement protein of tobacco mosaic virus in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 192-199.

- Zappa, S., Li, K. & Bauer, C. E. (2010).** The tetrapyrrole biosynthetic pathway and its regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *Adv Exp Med Biol* **675**, 229-250.
- Zhang, C. C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L. & Bedu, S. (2006).** Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* **59**, 367-375.
- Zhang, L., McSpadden, B., Pakrasi, H. B. & Whitmarsh, J. (1992).** Copper-mediated regulation of cytochrome c553 and plastocyanin in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* **267**, 19054-19059.
- Zhang, Z., Pendse, N. D., Phillips, K. N., Cotner, J. B. & Khodursky, A. (2008).** Gene expression patterns of sulfur starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Genomics* **9**, 344.
- Zhao, Y., Shi, Y., Zhao, W., Huang, X., Wang, D., Brown, N., Brand, J. & Zhao, J. (2005).** CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5744-5748.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. & Storz, G. (1999).** OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**, 4639-4643.
- Zhou, R. & Wolk, C. P. (2003).** A two-component system mediates developmental regulation of biosynthesis of a heterocyst polysaccharide. *J Biol Chem* **278**, 19939-19946.
- Zhu, J., Kong, R. & Wolk, C. P. (1998).** Regulation of *hepA* of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by elements 5' from the gene and by *hepK*. *J Bacteriol* **180**, 4233-4242.

Agradecimientos

Muchos han sido los compañeros que de una forma u otra durante estos cinco años de experiencia profesional han contribuido a fortalecer mi formación como investigador y a la realización de este trabajo, a todos mi más sincero agradecimiento. Quisiera agradecer de modo especial a quienes han sido durante estos años mis más cercanos maestros y compañeros de trabajo:

A mi tutora Dra. María Fillat y a la Dra. Marisa Peleato, por sus acertadas sugerencias, confianza y experiencia entregadas desde el principio. Gracias por el apoyo incondicional, tanto en el plano científico como en el personal, siempre les estaré agradecido.

A la Dra. Teresa Bes, no solo por la ayuda y consejos brindados, sino por sus valiosas críticas y las buenas discusiones científicas.

A los compañeros de laboratorio durante estos años: Emma, Silvia, Laura Botello, Violeta, Esther, Tais, Irene, pero muy especialmente a Vladimir, Xabi, Angela, Laura Calvo y David por la amistad y las cervezas compartidas.

A Emilio, Renzo, Juanjo, Reyes, Laura, Sonia, Ana, por los ratos libres y los Oktoberfests.

A Marta Fajes por toda la ayuda brindada, tu labor es encomiable.

A Pili, Mariví e Ismael por su imprescindible asistencia en todo momento. Gracias por la paciencia y la constante disposición de ayudar.

A la Dra. Raquel Moreno por su esmerada contribución en las qPCRs, al Dr. José Ramón Peregrina por su asistencia en las lecturas espectrofluorométricas y a la Dra. Inmaculada Yruela por su ayuda con el electrodo de oxígeno.

Al resto de los compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular que también dieron su aporte.

Gracias a Ana Valladares, Sergio, Victoria y demás miembros del grupo de Biología del Desarrollo en las Cianobacterias del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Mi

especial agradecimiento a los Dres Enrique Flores y Antonia Herrero por acogerme en su laboratorio como un miembro más durante mi breve estancia en el IBVF.

Mi total agradecimiento al Programa de Becas de Doctorado del Banco Santander, sin la cual el inicio de mis estudios hubiera sido imposible. Gracias al Programa Europa de Caja Inmaculada por la financiación de mi estancia en el IBVF.

Doy gracias por la nueva familia que inesperadamente he encontrado tan lejos de casa. En Zaragoza he realizado mis estudios de Doctorado, pero también he encontrado a un segundo padre, Juanjo, y a una extraordinaria mujer, amiga, compañera. Soy afortunado de tenerlos. Gracias a mi suegro por todo el cariño y la confianza depositados, no te defraudaré. De Marimar, qué puedo decir de Marimar? Lo eres todo para mí.

Agradezco a mi padre por haber sabido guiarme por el camino correcto, y a mi madre por su amor infinito; a ellos les debo lo que soy. Gracias a mi hermana por su cariño, su apoyo constante, su paciencia y consejos. Ha sido duro tenerlos lejos.

A todos, muchas gracias.