

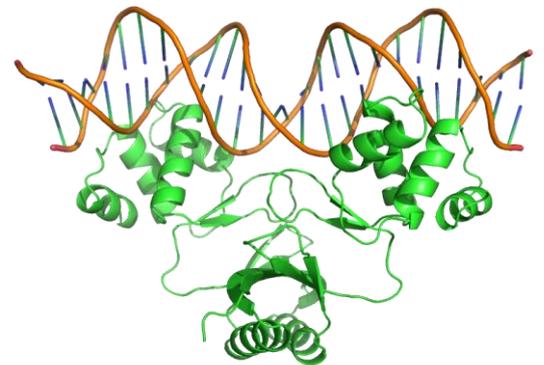
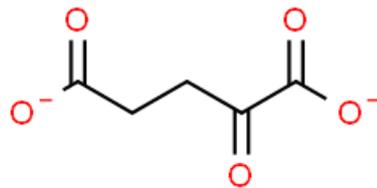
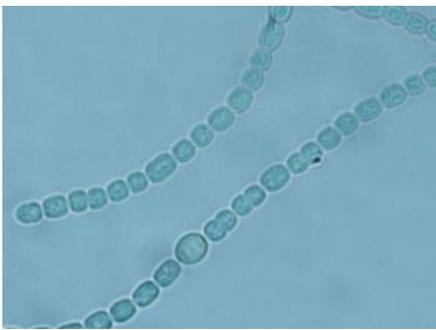
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Nuevas funciones de las proteínas Fur en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 y su posible actuación como sensores del balance carbono/nitrógeno



Jorge Guío Martínez

Junio 2019



Universidad
Zaragoza



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Nuevas funciones de las proteínas Fur en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 y su posible actuación como sensores del balance carbono/nitrógeno

New functions of Fur proteins in nitrogen metabolism of *Anabaena* PCC7120 and its possible role as sensors of carbon/nitrogen balance

Autor

Jorge Guío Martínez

Directora

Emma Sevilla Miguel

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias
Año 2019



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

La profesora Emma Sevilla Miguel

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Nuevas funciones de las proteínas Fur en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 y su posible actuación como sensores del balance carbono/nitrógeno” presentada por Jorge Guío Martínez ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

A su juicio, reúne todos los requisitos para ser presentada por su autor para la defensa de su Trabajo Fin de Máster

Zaragoza a 25 de junio de 2019

Emma Sevilla Miguel

“Sic parvis magna”

(La grandeza nace de pequeños comienzos)

Sir Francis Drake

Agradecimientos

En las primeras líneas de este trabajo me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que lo han hecho posible.

A mi directora Emma, por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, por cuidarme y preocuparse tanto por mí y por darme la oportunidad de aprender tanto de ella.

A María Fillat y Marisa Peleato, por ayudarme con la redacción de esta memoria y por haberse preocupado de que además de obtener muchos resultados fuera feliz en el laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio Cris e Irene y por haber podido disfrutar de vuestra compañía durante este trabajo y por haberme ayudado siempre con todo lo que habéis podido.

Al resto de mis compañeros del grupo de Regulación Génica y Fisiología de Cianobacterias: a Andrés Sandoval, por su ayuda en el mantenimiento de los cultivos de cianobacterias; a Andrés González, por sus consejos para la realización de los ensayos de retardo en gel y a Teresa Bes, por su ayuda para la interpretación de los resultados.

Al resto de investigadores que han dedicado parte de su tiempo en ayudarme a realizar este trabajo: al Dr. Adrián Velázquez, por su ayuda durante la realización de los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica; al Dr. Francisco Urbano, por su colaboración para la obtención de las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión y al Dr. Ignacio Luque, por sus consejos para realizar la tinción con Alcian Blue.

A mis compañeros de Biología Estructural: Sandra, María, Héctor, Alfonso, Juanjo, Silvia, Soraya, Daniel, Víctor, Martha, Ernesto y Nerea, por venirme a buscar todos los días para tomar el café y por todas las veces que nos hemos hecho compañía cuando los experimentos se alargaban más de lo pensado.

Y por último dar las gracias a mi familia, a Dios y a mis compañeras de máster Alba García, Vicky Peña y Sara Sentre porque su apoyo ha sido fundamental para poder realizar este trabajo.

Índice

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	3
2.1. Las cianobacterias	3
2.1.1. Características generales.....	3
2.1.2. Morfología y fisiología.....	3
2.1.3. Diferenciación celular en cianobacterias	4
2.2. Metabolismo de nitrógeno en cianobacterias	5
2.2.1. Asimilación de nitrato y nitrito.....	5
2.2.2. Asimilación de nitrógeno orgánico.....	6
2.2.3. Fijación de nitrógeno atmosférico.....	6
2.2.4. Aspectos genéticos de la diferenciación de heterocistos.....	7
2.3. El 2-oxoglutarato, un punto clave en la integración entre el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del carbono	10
2.3.1. Interrelación del metabolismo del carbono y del nitrógeno en cianobacterias.....	10
2.3.2. Sensores de 2-oxoglutarato en cianobacterias.....	11
2.4. La familia FUR en <i>Anabaena</i> PCC7120 y su relación con el metabolismo del nitrógeno.....	12
2.4.1. Proteínas Fur en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	13
2.4.2. Papel de FurA en el metabolismo del nitrógeno.....	14
2.4.3. Papel de FurC en el metabolismo del nitrógeno.....	14
2.5. Interés del trabajo.....	14
3. Hipótesis y objetivos del estudio	15
3.1. Hipótesis de trabajo.....	15
3.2. Objetivos del estudio.....	15
4. Materiales y métodos	16
4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.....	16
4.1.1. Cianobacterias.....	16
4.1.1.1. Cepas de cianobacterias	16
4.1.1.2. Condiciones de cultivo.....	16
4.1.1.3. Estudio de la respuesta de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno.....	17

4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	17
4.1.2.1. Cepas de <i>E. coli</i>	17
4.1.2.2. Condiciones de cultivo.....	17
4.2. Aislamiento y análisis de DNA.....	18
4.2.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	18
4.2.2. Extracción de DNA genómico de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	18
4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
4.2.4. Purificación y cuantificación de los productos de PCR.....	19
4.2.5. Electroforesis de DNA.....	19
4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias.....	19
4.3.1. Precauciones durante el trabajo con RNA.....	19
4.3.2. Toma de muestras para aislamiento de RNA de cianobacterias.....	19
4.3.3. Extracción del RNA.....	20
4.3.4. Tratamiento con DNasaI.....	20
4.3.5. Gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA.....	21
4.3.6. Cuantificación del RNA.....	21
4.3.7. Comprobación de la pureza del RNA aislado.....	21
4.3.8. Retrotranscripción.....	22
4.3.9. Estudios de expresión génica mediante Real Time RT-PCR.....	22
4.4. Métodos genéticos.....	22
4.4.1. Preparación de células de <i>E.coli</i> termocompetentes.....	22
4.4.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico.....	23
4.5. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes.....	23
4.5.1. Prueba de sobreexpresión.....	23
4.5.2. Obtención de biomasa e inducción de la sobreexpresión.....	24
4.5.3. Lisis celular.....	24
4.5.4. Purificación de FurA.....	24
4.5.5. Purificación de FurC.....	25
4.6. Técnicas analíticas de proteínas.....	26
4.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	26
4.6.2. Calorimetría de titulación isotérmica.....	27
4.7 Ensayos de retardo en gel (EMSA).....	27

4.8. Aproximaciones bioquímicas y otras técnicas analíticas.....	28
4.8.1. Extracción de proteínas totales solubles	28
4.8.2. Determinación de proteína total.....	28
4.8.3. Determinación de clorofila <i>a</i>	28
4.8.4. Determinación de ficobiliproteínas.....	29
4.8.5. Determinación de carotenoides.....	29
4.8.6. Contaje celular.....	29
4.9. Técnicas de microscopía.....	30
4.9.1. Microscopía de campo luminoso y de fluorescencia	30
4.9.2. Tinción con “Alcian Blue”.....	30
4.9.3. Microscopía electrónica de transmisión	30
5. Resultados y discusión	31
5.1. Papel de FurC en la regulación de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno.....	31
5.1.1. Análisis del perfil transcriptómico de la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno.....	31
5.1.1.1. Genes implicados en diferenciación y maduración de heterocistos.....	33
5.1.1.2. Genes implicados en fijación y metabolismo del nitrógeno.....	34
5.1.2. Análisis por Real Time RT-PCR de cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno.....	35
5.1.3. Estudio de la unión de FurC a promotores de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno	36
5.2. Aspectos morfológicos y respuestas fisiológicas de la estirpe EB2770FurC a la deficiencia de nitrógeno.....	40
5.2.1. Aspectos morfológicos.....	40
5.2.1.1. Tinción con “Alcian Blue”.....	40
5.2.1.2. Observación mediante microscopía de campo luminoso y de fluorescencia.....	41
5.2.1.3. Observación mediante TEM.....	42
5.2.2. Niveles de proteína total soluble y pigmentos fotosintéticos.....	43

5.3. Las proteínas Fur como potenciales sensores del balance carbono/nitrógeno a través de la unión con 2-oxoglutarato (2-OG).....	44
5.3.1. Estudio de la interacción del 2-OG con FurA y FurC mediante calorimetría de titulación isotérmica.....	45
5.3.1.1. Estudio de la interacción de FurA con 2-OG.....	45
5.3.1.2. Estudio de la interacción de FurC con 2-OG.....	46
5.3.2. Efectos del 2-OG sobre la función biológica de FurA y FurC.....	48
5.3.2.1. Estudio de la actividad de unión al DNA de FurA en presencia de 2-OG.....	48
5.3.2.2. Estudio de la actividad de unión al DNA de FurC en presencia de 2-OG.....	50
5.4. Discusión global.....	51
5.4.1 Participación de FurC en la regulación del metabolismo del nitrógeno en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	51
5.4.2 Las proteínas Fur como sensores del balance carbono/nitrógeno.....	54
6. Conclusiones	55
7. Bibliografía	56

Abreviaturas

2-OG: 2-oxoglutarato

2-OGDH: 2-oxoglutarato deshidrogenasa

ABC: ATP-binding cassette

Abs: Absorbancia

ACC: Acetil-coA carboxilasa

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

CRP: cAMP response protein (Proteína receptora de cAMP)

DEAE: Dietil-aminoetil

DH: Deshidrogenasa

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay (ensayo de retardo en gel)

FNR: Ferredoxina-NADP⁺ reductasa

Fur: Ferric Uptake Regulator

GDH: Glutamato deshidrogenasa

GOGAT: Glutamato sintasa

GS: Glutamina sintetasa

Hep: Heterocyst envelope polysaccharides (polisacáridos de la envuelta del heterocisto)

Hgl: Heterocyst glycolipids (glicolípidos del heterocisto)

IMAC: Immobilized metal affinity chromatography (cromatografía de afinidad a un ion metálico)

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Irr: Iron Responsive Regulator

ITC: Isothermal Titration Calorimetry (calorimetría de titulación isotérmica)

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

MFS: Major Facilitator Superfamily of proteins

Mur: Manganese Uptake Regulator

MW: Molecular weight (peso molecular)

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAGK: N-acetil-L-glutamato kinasa

Nur: Nickel Uptake Regulator

Pb: Pares de bases

PCC: Colección de cultivos del Instituto Pasteur

PCR: Polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PEP: Fosfoenolpiruvato

PerR: Peroxide Stress Response

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSI: Fotosistema I

PSII: Fotosistema II

RNAseq: Secuenciación del RNA

RR: Regulador de respuesta

RT-PCR: Reverse transcription polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

RuBisCO: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

SD: Desviación estándar

SDS: Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sodio)

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)

SK: Sensor kinasa

TCA: Ácido tricloroacético

TEM: Microscopía electrónica de transmisión (Transmission electron microscopy)

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

WT: Wild Type (silvestre)

Zur: Zinc Uptake Regulator

ϵ : Coeficiente de extinción molar

1. Resumen/Abstract

1.1. Resumen

Las proteínas FUR (Ferric Uptake Regulator) son reguladores transcripcionales que controlan la homeostasis de metales y están presentes en la mayoría de organismos procariotas. Sin embargo en cianobacterias se piensa que tienen una función más global y controlan otros procesos, como por ejemplo el metabolismo del nitrógeno. *Anabaena* PCC7120 es una cianobacteria filamentososa capaz de fijar nitrógeno atmosférico que presenta tres parálogos de proteínas FUR, FurA, FurB y FurC. Estudios previos mostraron que FurA estaba implicada en la diferenciación de heterocistos, células especializadas en la fijación de nitrógeno, y sugerían que FurC también podría desempeñar algún papel en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

En este trabajo se ha analizado el transcriptoma de una estirpe de sobreexpresión de FurC en deficiencia de nitrógeno y se ha estudiado su morfología y fisiología en esas condiciones. Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de este regulador transcripcional impide la formación de heterocistos y que FurC regula directamente la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes de nitrógeno y la diferenciación de heterocistos. Además, dado que en cianobacterias el 2-oxoglutarato actúa como molécula señalizadora del balance carbono/nitrógeno, también se ha estudiado si FurA y FurC eran capaces de actuar como sensores de este metabolito. Se ha determinado que ambas proteínas son capaces de unirse a este compuesto lo que postula a ambas proteínas como potenciales sensores del balance carbono/nitrógeno. Además en el caso de FurA esta interacción modula su actividad de unión al DNA.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que las proteínas FUR son reguladores globales en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, con implicaciones importantes en la regulación del metabolismo del nitrógeno y la formación de heterocistos.

1.2. Abstract

FUR proteins (Ferric Uptake Regulator) are transcriptional regulators which control metal homeostasis and can be found in most prokaryotic organisms. However, it is thought that in cyanobacteria they play a global regulatory role and control other processes, such as nitrogen metabolism. In the filamentous, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 three FUR paralogues can be found: FurA, FurB and FurC. Previous studies showed that FurA was involved in heterocyst differentiation, cells that are specialized in nitrogen fixation, and suggested that FurC could play a relevant role in nitrogen metabolism regulation.

In this work the transcriptomic profile of a FurC overexpression strain in nitrogen deprivation conditions has been analyzed and its morphology and physiology under these conditions have been studied. Results show that the overexpression of this transcriptional regulator suppresses heterocyst formation and that FurC directly regulates the expression of genes involved in nitrogen assimilation and heterocyst differentiation. In addition, since 2-oxoglutarate is a signal molecule that reflects the cellular carbon/nitrogen balance in cyanobacteria, it has also been studied whether FurA and FurC were able to act as sensors for this metabolite. It has been determined that both proteins are capable of binding to this compound, postulating them as putative sensors of carbon/nitrogen balance. Furthermore, in the case of FurA, this interaction modulates its DNA binding activity.

The results obtained in this work confirm FUR proteins as global regulators in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120, playing relevant roles in nitrogen metabolism control and heterocyst differentiation.

2. Introducción

2.1. Las cianobacterias

2.1.1. Características generales

Las cianobacterias constituyen el grupo más grande, diverso y ampliamente distribuido de procariotas fotosintéticos. También llamadas cianofíceas o cianofitos se clasifican dentro de las Eubacterias, constituyendo uno de los subgrupos más grandes de Gram negativos (1). Se estima que se originaron en la era Proterozoica hace unos 3500 millones de años y desempeñaron un papel clave en el desarrollo de la vida en la Tierra, pues fueron las responsables de transformar la atmósfera reductora en una atmósfera oxidante (1). Esto se debe a que las cianobacterias fueron las primeras formas de vida en desarrollar la fotosíntesis oxigénica, es decir, en ser capaces de utilizar el agua como donador de electrones liberando oxígeno en el proceso (2). Además se considera que son el ancestro evolutivo de los cloroplastos, siendo por tanto fundamentales para el desarrollo de los eucariotas fotosintéticos (3).

Se trata de un grupo de microorganismos muy ubicuo, pues gracias a su diversidad morfológica y metabólica las cianobacterias han sido capaces de adaptarse a condiciones muy diversas, desde hábitats marinos o fluviales hasta climas polares o desérticos, pasando por suelos, rocas o fuentes hidrotermales (4). Actualmente tienen una gran importancia ecológica, pues son los principales productores primarios de los océanos (5). Esto se debe a que algunas especies son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, reduciéndolo a amonio, de forma que puede ser utilizado por otros organismos. No obstante su crecimiento excesivo puede ser perjudicial, pues da lugar a los denominados *blooms* de cianobacterias, que pueden alterar la calidad del agua y ocasionar la muerte de formas de vida autóctonas, así como producir cianotoxinas (6).

2.1.2. Morfología y fisiología

Las cianobacterias presentan una gran diversidad morfológica, pudiendo ser unicelulares como *Cyanothece* o filamentosas como *Spirulina*, y su tamaño varía entre 1 μm en las cianobacterias unicelulares como *Prochlorococcus* hasta los 30 μm en el caso de los géneros de mayor tamaño (1). No obstante todas ellas presentan características metabólicas y estructurales similares.

Las células de las cianobacterias están rodeadas por una pared celular que define su forma, controla el transporte de sustancias y permite resistir la presión de turgencia. Esta se compone de una capa de peptidoglicanos, una membrana externa y, en algunas especies, una cubierta externa S formada por proteínas y glicoproteínas (7). Además las cianobacterias también se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de inclusiones intracelulares en su citoplasma como gránulos de glucógeno, polifosfato o cianoficina, que sirven como reserva de carbohidratos, fosfato y nitrógeno, respectivamente (7).

Su aparato fotosintético se ubica en los tilacoides, membranas intracitosólicas que, a diferencia de los tilacoides cloroplásticos, no se encuentran englobados por una membrana formando organelos, sino que se sitúan en la periferia del citoplasma (8). Aunque el aparato fotosintético de las cianobacterias es semejante al de los cloroplastos en cuanto a su funcionamiento y su estructura, presenta diferencias en la composición de pigmentos. Las cianobacterias contienen clorofila *a* como pigmento mayoritario y carecen de clorofila *b*, presente en algas y plantas (8).

Además poseen ficobilisomas, que son agregados supramoleculares de ficobiliproteínas, las cuales pueden llegar a representar el 50% de las proteínas de la célula y pueden servir como fuente de nitrógeno y carbono en condiciones adversas (9). Los ficobilisomas se encuentran en los complejos antena y transfieren la energía a la clorofila diana presente en los centros de reacción del fotosistema I (PSI) y del fotosistema II (PSII) (9).

2.1.3. Diferenciación celular en cianobacterias

Algunas estirpes de cianobacterias filamentosas son capaces de desarrollar a partir de células vegetativas tres tipos distintos de células especializadas, denominadas hormogonios, acinetos y heterocistos, y que suponen uno de los pocos ejemplos de diferenciación celular en procariotas.

Los hormogonios son filamentos cortos de células que se diferencian de las células vegetativas porque tienen un menor tamaño y porque presentan movilidad, alejándose de los filamentos parentales una vez diferenciados (10). Comúnmente contienen vesículas de gas que permiten regular su flotabilidad en el agua y suelen presentar fototaxis positiva, lo que les permite desplazarse para colonizar regiones de mayor intensidad luminosa (11). Estas células presentan importantes reservas de fósforo y nitrógeno y son muy importantes en la dispersión de células (12).

Los acinetos son formas de resistencia que aparecen en presencia de condiciones ambientales desfavorables como desecación o exposición al frío, siendo capaces de germinar y dar lugar a células vegetativas cuando las condiciones son favorables (13). Se caracterizan por presentar una gruesa envoltura celular y por acumular sustancias de reserva como gránulos de glucógeno o cianoficina (13).

Los heterocistos son células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico, que se diferencian a partir de células vegetativas en respuesta a la deficiencia de una fuente de nitrógeno combinado como amonio o nitrato (14). El proceso de fijación de nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, la forma asimilable por los sistemas biológicos, y es llevado a cabo por la enzima nitrogenasa, un complejo enzimático extremadamente sensible al oxígeno (14). Dado que las cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, en la cual se libera oxígeno, es necesario separar este proceso de la fijación de nitrógeno (15). Para ello existen dos estrategias, la separación temporal, consistente en realizar la fotosíntesis durante el día y la fijación de nitrógeno durante la noche, o bien la separación espacial, que se basa en la formación de una célula especializada, el heterocisto, y que llevada a cabo por la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, entre otras.

La formación del heterocisto a partir de células vegetativas implica una serie de importantes cambios morfológicos y metabólicos, basados en un proceso de expresión génica diferencial muy complejo (14):

- Se forman dos gruesas envolturas celulares, una interna formada por glicolípidos y otra externa formada por polisacáridos que impiden la difusión de oxígeno al interior celular.
- Se produce un incremento en la proteólisis y se degradan las ficobiliproteínas para ser utilizadas como fuente de nitrógeno, lo que hace que el heterocisto tenga una pigmentación más débil que las células vegetativas. Además se forman gránulos polares de cianoficina en los puntos de unión con las células vegetativas para servir como reserva de nitrógeno.

- Se desmantela el fotosistema II para evitar la producción de oxígeno, lo que da lugar a una pérdida de pigmentos fotosintéticos, y se incrementa la actividad oxidasa para consumir el oxígeno remanente.
- Se pierde la capacidad de fijar CO₂ al no expresarse el enzima RuBisCO, lo que garantiza que las reservas energéticas y de poder reductor no se emplean en otras rutas que no sean la fijación de nitrógeno.

Los heterocistos mantienen una estrecha comunicación e intercambio de metabolitos y señales con las células vegetativas gracias a la existencia de un espacio periplásmico continuo y de septos muy estrechos como consecuencia de las grandes envueltas que rodean al heterocisto. Puesto que los heterocistos no pueden llevar a cabo la fijación de CO₂ reciben los carbohidratos de las células vegetativas, los cuales proporcionan el poder reductor necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa y esqueletos carbonados a los que se incorpora el nitrógeno fijado por el heterocisto, que es transportado a las células vegetativas en forma de glutamina (12).

2.2. Metabolismo de nitrógeno en cianobacterias

El metabolismo del nitrógeno en cianobacterias es de gran importancia ya que permite la incorporación de este elemento a las cadenas tróficas. La forma de nitrógeno preferida por las cianobacterias es el amonio, pues es el metabolito que se incorpora a los esqueletos carbonados. El amonio puede incorporarse a través de permeasas específicas (Amt) (16) pero generalmente procede del metabolismo de otras formas de nitrógeno, principalmente de la asimilación de nitrato y nitrito, y en menor medida de la metabolización de moléculas orgánicas simples como urea o aminoácidos (17). Además, si estas fuentes no están disponibles, ciertas especies de cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (14).

2.2.1. Asimilación de nitrato y nitrito

En la mayoría de las cianobacterias, incluyendo *Anabaena* PCC7120, la captación de nitrato y nitrito es llevada a cabo por un transportador de tipo ABC (ATP-binding cassette) que permite la entrada de estos metabolitos aunque se encuentren a bajas concentraciones en el medio extracelular (18). Este transportador consta de varias subunidades, codificadas por los genes *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD*. Las subunidades NrtC y NrtD conforman un módulo de unión a ATP e interaccionan con un dímero de subunidades NrtB anclado en la membrana, constituyendo el transportador funcional, mientras que la subunidad NrtA es una proteína periplásmica anclada a la membrana que interacciona con el nitrato y el nitrito (19). No obstante en algunas cianobacterias marinas se ha descrito que la incorporación de nitrato y nitrito tiene lugar a través de un transportador de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily of proteins*) cuya fuente de energía se piensa que puede ser un gradiente de sodio o de protones (20).

Una vez en el interior celular la nitrato reductasa (*narB*) transforma el nitrato en nitrito, el cual puede transformarse en amonio por la acción de la nitrito reductasa (*nirA*). Ambas enzimas catalizan reacciones de reducción en las que el poder reductor es aportado por la ferredoxina, conectando así la asimilación de estos compuestos con la fotosíntesis (21), aunque también son capaces de utilizar la flavodoxina como donador de electrones en condiciones de déficit férrico (22). En muchas especies la nitrito y la nitrato reductasa forman un operon junto con los genes que controlan la captación de nitrato y nitrito, el operon *nirA-nrtABCD-narB*, el cual regula la

asimilación de estos metabolitos. Este sistema de asimilación está regulado tanto a nivel transcripcional como post-traducciona l y se ve inhibido en presencia de amonio, pues en presencia de una fuente de nitrógeno de fácil asimilación no es necesario incorporar nitrato o nitrito del medio externo (23).

2.2.2. Asimilación de nitrógeno orgánico

Las cianobacterias también son capaces de utilizar fuentes de nitrógeno orgánico como la urea o algunos aminoácidos. La urea procede de la degradación de ácidos nucleicos y aminoácidos y es excretada como producto de desecho por muchos seres vivos, por lo que también supone una fuente relevante de nitrógeno para las cianobacterias (24). La urea entra al interior celular mediante un transportador de tipo ABC codificado por el operón *urtABCDE* y es posteriormente degradada a amonio y CO₂ por acción de la ureasa, metaloenzima dependiente de Ni²⁺. La ureasa consta de tres subunidades estructurales, codificadas por los genes *ureA*, *ureB* y *ureC*, y para su correcto funcionamiento se requiere además de cuatro proteínas accesorias, UreD, UreE, UreF y UreG, necesarias para su correcto ensamblaje (25).

Además, algunos aminoácidos, como la arginina o glutamina, también pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno. La glutamina accede al interior celular a través de un sistema de transporte de aminoácidos neutros y puede entrar al ciclo GS-GOGAT dando lugar a glutamato y amonio (26). Por su parte la arginina es introducida a través de un sistema de transporte de aminoácidos básicos y puede ser metabolizada por la arginina descarboxilasa, dando lugar a poliaminas, o por la arginasa y el ciclo de la urea dando lugar a glutamato y amonio (27).

2.2.3. Fijación de nitrógeno atmosférico

En ausencia de una fuente de nitrógeno combinado algunas especies de cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, es decir, son diazótrofas. Este proceso es llevado a cabo, como se ha comentado previamente, por un complejo multienzimático, la nitrogenasa, que se inactiva rápida e irreversiblemente en presencia de oxígeno (14). La nitrogenasa tiene dos componentes, la dinitrogenasa reductasa y la dinitrogenasa, codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK*, que forman el operon *nifHDK*. La dinitrogenasa reductasa esta codificada por el gen *nifH* y es un homodímero que presenta un centro sulfoferrico (4Fe-4S) entre sus dos subunidades mientras que la dinitrogenasa es un heterotetrámero formado por dos subunidades α , codificadas por el gen *nifD* y dos subunidades β , codificadas por el gen *nifK*, y contiene dos centros sulfoferricos P y dos cofactores Fe-Mo (26). La dinitrogenasa reductasa capta los equivalentes de reducción de la ferredoxina (en otros diazótrofos puede ser la flavodoxina) y, empleando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, los cede a la dinitrogenasa. Estos electrones son captados por los centros P de la dinitrogenasa y transferidos al cofactor Fe-Mo, donde tiene lugar la reducción del N₂ atmosférico a amonio (26). El operon *nifHDK* se encuentra en el mismo cluster que otros genes que codifican para proteínas de maduración de la nitrogenasa y donadores de electrones, como *fdxH*, que codifica para una ferredoxina específica del heterocisto (26). Además en *Anabaena* PCC7120 existen dos nitrogenasas alternativas, una que se piensa que es un vestigio evolutivo y que esta codificada por el cluster *nif2* y otra dependiente de vanadio que está codificada por el cluster *vnf* y permite la fijación de nitrógeno en condiciones de deficiencia de molibdeno (28).

2.2.4. Aspectos genéticos de la diferenciación de heterocistos

La diferenciación de heterocistos es un proceso muy complejo que se produce gracias a la expresión secuencial de varios genes regulados por múltiples factores de transcripción y que implica la integración de diversas señales hasta que se produce maduración completa del heterocisto. Todo este proceso está orquestado por NtcA, el regulador global de la asimilación de nitrógeno, y por HetR, un regulador específicamente implicado en la diferenciación del heterocisto (29). La formación del heterocisto comienza porque, como consecuencia de la falta de nitrógeno combinado, se produce un incremento en los niveles de 2-oxoglutarato (2-OG), un metabolito que aporta el esqueleto carbonado al que se incorpora el amonio mediante el ciclo GS-GOGAT (17). Este metabolito, como se explica con más detalle en la sección 2.3.2., actúa como un activador alostérico de NtcA, que a su vez activa la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno y en la incorporación del amonio a esqueletos carbonados. NtcA también permite que se inicie proceso de diferenciación de heterocistos, ya que activa la expresión de *hetR* de forma indirecta, a través de una proteína denominada NrrA (23,30). Por su parte HetR activa la expresión de genes importantes para el proceso de diferenciación como *hepA*, *hetP*, *hetZ* y *patS* (31), regulando su propia expresión y la de *ntcA* (32).

Una etapa importante en la diferenciación de heterocistos es el establecimiento de un patrón, pues no estas células se distribuyen al azar a lo largo del filamento sino que están separados por entre 10 y 15 células vegetativas (12). Este proceso tiene lugar unas 8 horas después de haberse sentido la deficiencia de nitrógeno y se produce gracias a la existencia de dos señales, una que induce la diferenciación y otra que la inhibe (11). Las señales de inhibición son PatS y HetN, que impiden la formación de heterocistos contiguos al ser transferidas a células vecinas (33). La expresión de PatS está inducida por HetR mientras que HetN es producida por heterocistos maduros y ambas interactúan con HetR, impidiendo su unión al DNA y por tanto que comience la formación del heterocisto (33). Por el contrario HetR se activa en presencia de HetF y PatA, las señales de activación, que son esenciales para bloquear las señales de inhibición en las células que inician el desarrollo a heterocistos (34). Se piensa que PatA podría secuestrar a PatS y HetN impidiendo que inhiban a HetR o que podría interactuar directamente con HetR, haciéndola inmune al efecto inhibitorio de PatS y HetN (34).

Inicialmente un grupo de células vegetativas comienza el proceso de diferenciación a heterocistos porque al aumentar los niveles de 2-oxoglutarato se produce un proceso complejo de activación de la expresión de NtcA que conduce a un aumento en los niveles de este regulador transcripcional (32). A continuación, comienza a inducirse la síntesis de HetR, pero se produce una competencia entre estas células porque al expresarse HetR comienzan a sintetizar señales inhibitorias como PatS (35). La célula que finalmente dará lugar al heterocisto será aquella que presente niveles más altos de NtcA, pues esta proteína induce la expresión de la señal de activación PatA y de HetC, un transportador de tipo ABC que junto con SepJ exporta a PatS fuera de la célula (35,36). De esta manera en esa célula las señales de activación serán altas, pues se está expresando PatA, y las señales de inhibición bajas, pues PatS está siendo exportado a las células vecinas, en las que por el contrario predominarán las señales inhibitorias. Así se consigue que solo una célula de lugar al proheterocisto, un estadio intermedio de diferenciación distinguible de las células vegetativas (14), mientras que el resto revertirán su estado, originándose un patrón con los heterocistos espaciados. Este proceso se esquematiza en la figura 1.

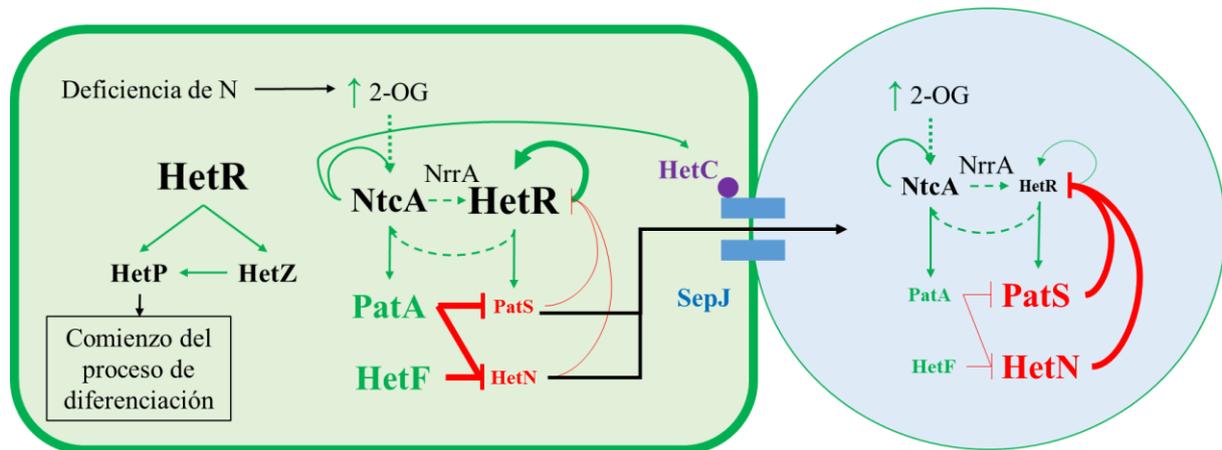


Figura 1. Representación esquemática del balance entre señales de activación y de inhibición que da lugar a la formación del patrón de heterocistos. La activación de genes se representa con flechas verdes, continuas en el caso de activación directa y discontinuas en caso de activación indirecta. Las líneas rojas terminadas en una barra representan inhibición a nivel proteico y las flechas verdes punteadas activación a nivel protéico. Adaptado de (35).

Una vez que se ha establecido este patrón y una célula ha comenzado el proceso de diferenciación a heterocistos, HetR activa la expresión de dos proteínas, HetZ y HetP. Aunque su función no es bien conocida se ha propuesto que HetP interacciona con HetR permitiendo la activación de los genes necesarios para la maduración del heterocisto mientras que HetZ es un regulador transcripcional necesario, junto con HetR, para la expresión de HetP (37).

Unas 12 horas después de que se haya sentido la deficiencia de nitrógeno, se comienzan a expresar los genes necesarios para la formación de las envueltas del heterocisto, la interna de glicolípidos (Hgl) y la externa de polisacáridos (Hep) (35). La síntesis de la envuelta de glicolípidos depende de la expresión de genes como *hglC* y *hglE*, que codifican para glicolípidos sintetas, y de los operones *devBCA*, que codifican para transportadores de tipo ABC implicados en depositar los glicolípidos y posteriormente los polisacáridos (35). Su expresión está controlada por HetR, que regula la expresión de *devBCA*, HenR, un regulador de respuesta de un sistema de dos componentes que regula a *hglC* y *hglE* y DevH, una proteína de unión a DNA homóloga a NtcA que regula a los tres genes (35). Por su parte la síntesis de la envuelta de polisacáridos es llevada a cabo por HepA, un transportador de tipo ABC implicado en la deposición de los polisacáridos y las glicosiltransferasas HepB y HepC y está controlada por un sistema de dos componentes en el que existen dos sensores quinasa, HepK y HepN, y un regulador de respuesta, DevR (35).

Finalmente, tras 24 horas en deficiencia de nitrógeno, NtcA activa en los heterocistos la expresión de genes como *petH*, que codifica para la ferredoxina-NADP⁺ reductasa del heterocisto (FNR), *glnA*, que codifica para la glutamina sintetasa o el operón *nifHDK*, que codifica para la nitrogenasa (14). La expresión de la nitrogenasa requiere que se produzca la excisión de fragmentos génicos que interrumpen la secuencia de los genes *nifD* (subunidad α de la nitrogenasa), *fdxN* (ferredoxina del heterocisto) y *hupL* (subunidad de la hidrogenasa) (14). Estas excisiones son llevadas a cabo por las recombinasas XisA, XisF y XisC, respectivamente (14).

Un esquema general del proceso de diferenciación de heterocistos se recoge en la figura 2.

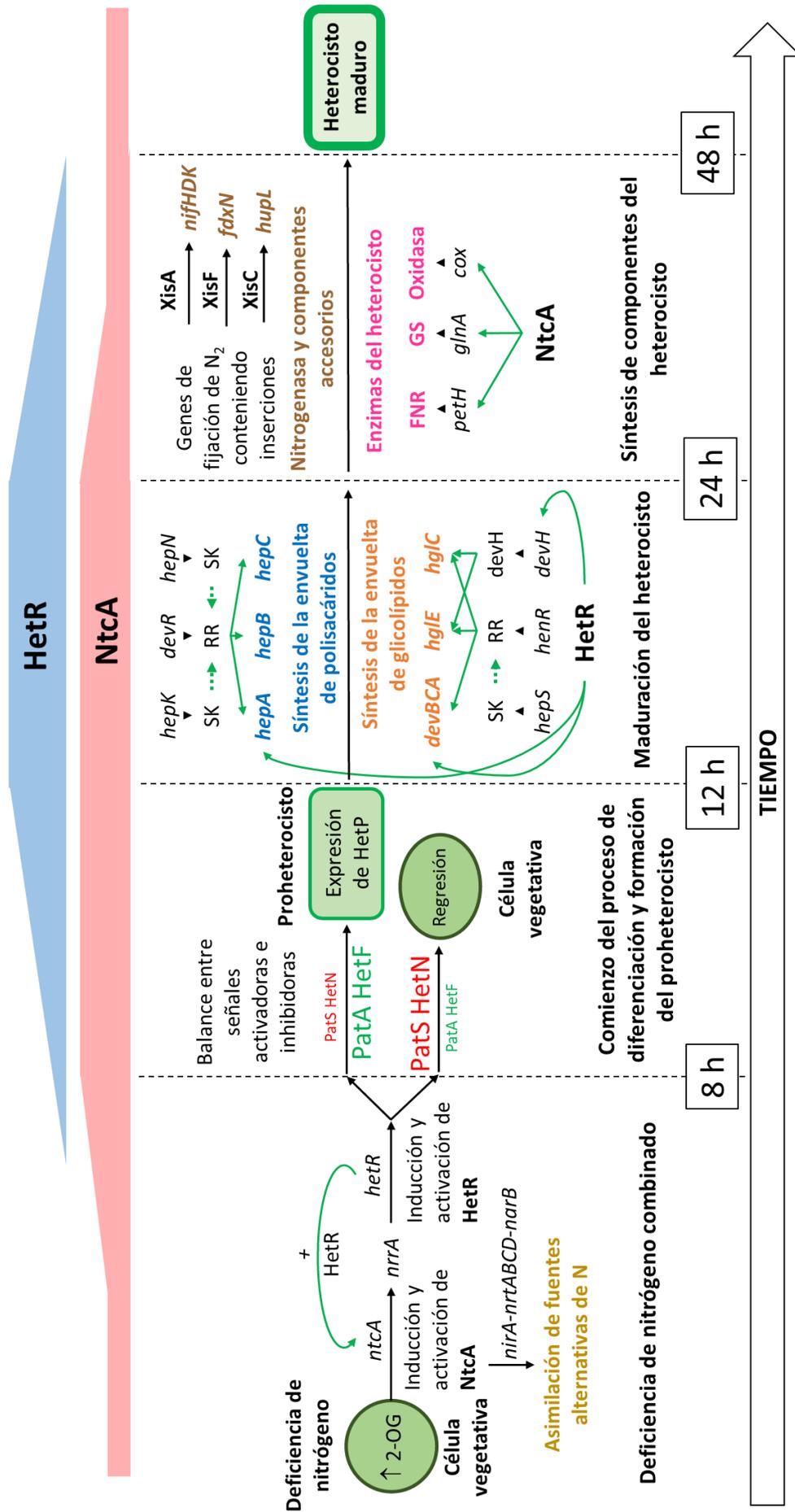


Figura 2. Representación esquemática de la expresión de genes necesaria para la diferenciación de células vegetativas a heterocistos a lo largo del tiempo. Se representa también la variación en los niveles de HetR y NtcA a lo largo del proceso. La activación de genes se representa con flechas verdes sólidas, la transcripción de genes a proteínas con cabezas de flecha verdes y la activación a nivel proteico mediante flechas verdes punteadas. Adaptado de (38).

2.3. El 2-oxoglutarato, un punto clave en la integración entre el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del carbono

El metabolismo del carbono y del nitrógeno es esencial en cualquier sistema biológico, pues los principales componentes celulares, incluyendo los ácidos nucleicos, las proteínas o las membranas, derivan de estos procesos metabólicos. Al tratarse de dos elementos esenciales para la vida su metabolismo está íntimamente relacionado en todos los organismos, pero la relación es más estrecha en organismos capaces de asimilar diferentes fuentes de nitrógeno como las cianobacterias.

2.3.1. Interrelación del metabolismo del carbono y del nitrógeno en cianobacterias

El amonio se incorpora a los esqueletos carbonados gracias a la acción secuencial de dos enzimas, la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT), lo que se conoce como ciclo GS-GOGAT (39). En primer lugar, la glutamina sintetasa (GS), gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP, cataliza la incorporación del amonio al glutamato formando glutamina. A continuación actúa la glutamato sintasa (GOGAT), que cataliza la transferencia reductiva de un grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, dando lugar a dos moléculas de glutamato. No obstante en algunas cianobacterias existe además una vía minoritaria, la glutamato deshidrogenasa (GDH), que incorpora el amonio al 2-oxoglutarato produciendo glutamato (39).

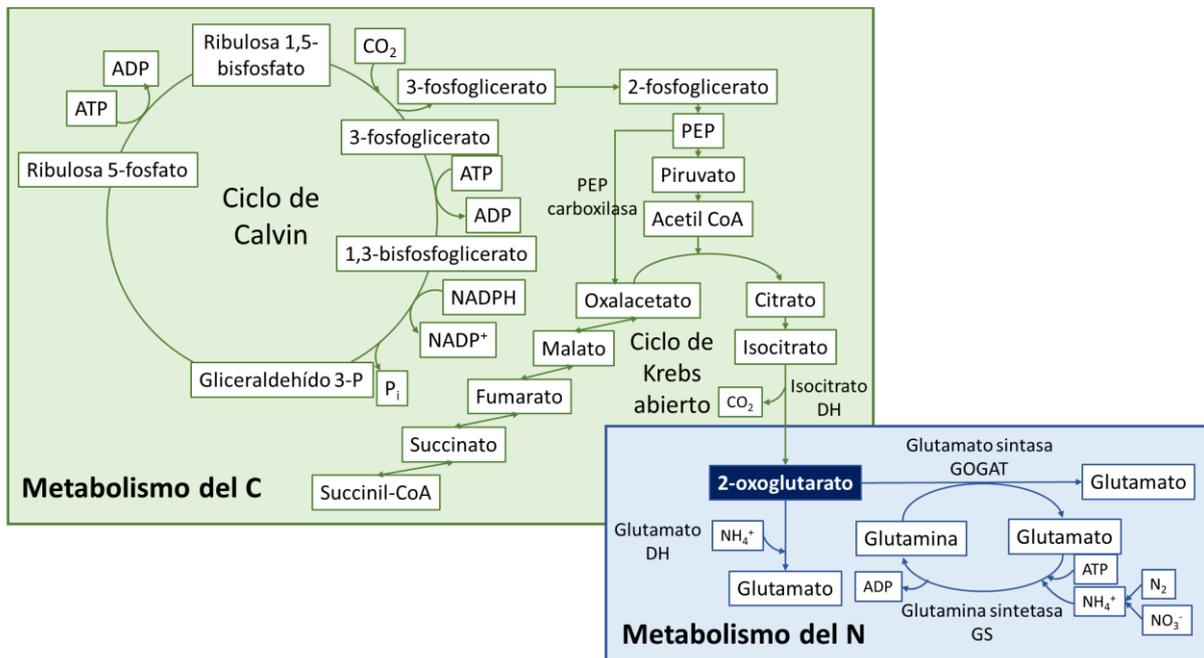


Figura 3. Interconexión entre el metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno a través de 2-oxoglutarato. Adaptado de (17).

Las cianobacterias carecen de las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH) y succinil CoA sintetasa, lo que implica que el 2-oxoglutarato no pueda ser convertido en succinil CoA y hace que presenten un ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs incompleto (17). Por ello, cuando el 3-fosfoglicerato que se genera en el ciclo de Calvin es metabolizado se genera como producto final 2-oxoglutarato, cuya función es proporcionar esqueletos carbonados para la incorporación de amonio a través del ciclo GS-GOGAT (Figura 3) (17). Por estos motivos, el ciclo GS-GOGAT y en concreto el 2-oxoglutarato representan el punto de conexión entre el metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno y la concentración de 2-oxoglutarato es un excelente indicador del balance carbono/nitrógeno en las cianobacterias (40). Así, cuando hay un exceso de compuestos carbonados o el nitrógeno combinado es escaso en el interior celular se produce una acumulación de 2-oxoglutarato, lo que es indicativo de que el balance carbono/nitrógeno es alto.

2.3.2. Sensores de 2-oxoglutarato en cianobacterias

El 2-oxoglutarato actúa como una señal del balance carbono/nitrógeno porque proporciona esqueletos carbonados en la fijación de nitrógeno y porque sus niveles varían dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno, incrementándose en condiciones de deficiencia de este elemento tanto en cianobacterias diazótroficas como no diazótroficas. Además el 2-oxoglutarato desempeña una función señalizadora, no solo en cianobacterias, sino también en otras bacterias, en animales, en plantas y en humanos (41). Por ejemplo en *E. coli* puede ser sentido por el sistema de dos componentes KguS/KguR, que activa la transcripción de genes que permiten utilizar el 2-oxoglutarato como fuente de carbono en condiciones anaeróbicas (42). En cianobacterias existen dos sensores de 2-oxoglutarato que son bien conocidos, NtcA y PII.

La proteína PII es un homotrímero que actúa como sensor del balance carbono/nitrógeno y de la disponibilidad de energía, gracias a su capacidad de interactuar con 2-oxoglutarato y con ADP/ATP-Mg²⁺ respectivamente (43). La interacción con estos metabolitos da lugar a cambios conformacionales en un bucle T flexible que afectan a su capacidad de interactuar con otras proteínas como PipX, que es un coactivador del regulador transcripcional NtcA; NAGK (N-acetil-L-glutamato kinasa), un enzima que participa en la síntesis de arginina; el transportador de nitrato/nitrito Nrt; o la acetil-coA carboxilasa (ACC) (40). En concreto la interacción de PII con estas proteínas se produce en condiciones de suficiencia de nitrógeno, es decir, cuando los niveles de 2-oxoglutarato son bajos. En estas condiciones, gracias a las interacciones proteína-proteína, PII impide que la arginina pueda ejercer una retroinhibición sobre la actividad de la NAGK, lo que da lugar a un incremento en la síntesis de este aminoácido que se almacena en los gránulos de cianoficina para actuar como reserva de nitrógeno (40). Además interacciona con la subunidad NrtC del transportador de nitrato, permitiendo que el amonio ejerza su función represora sobre este transportador, e inhibe la actividad de la ACC, lo que impide la transformación del acetil-CoA en malonil-CoA para dar lugar a la síntesis de ácidos grasos y ocasiona un aumento en los niveles de 2-oxoglutarato, permitiendo que el nitrógeno se incorpore a esqueletos carbonados y se sinteticen reservas de nitrógeno (40). Finalmente, al secuestrar a PipX, impide que esta proteína actúe como coactivador de NtcA, el regulador global del metabolismo del nitrógeno (43).

NtcA es un regulador transcripcional perteneciente a la familia CRP (cAMP response protein) que actúa en forma de homodímero, uniéndose al DNA por un motivo hélice-giro-hélice presente en su extremo carboxilo terminal (44). Además de su papel central en la diferenciación del heterocisto NtcA también activa la transcripción de la proteína de degradación del ficobilisoma (*nblA*), así como la de la glutamina sintetasa (*glnA*) y de otros genes esenciales para la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno, como el operón *nirA-nrtABCD-narB* para la asimilación de nitrato y nitrito o el operón *urtABCDE* para la asimilación de urea (45). Su actividad de unión al DNA se ve potenciada además de por PipX por el 2-oxoglutarato, que se une a su dominio amino-terminal en presencia de $MgCl_2$, transmitiendo cambios conformacionales al dominio de unión al DNA que mejoran su afinidad por las regiones promotoras (46). De esta manera el 2-oxoglutarato afecta a la actividad de NtcA directamente, como efector alostérico, y de forma indirecta a través de PII y PipX.

2.4. La familia FUR en *Anabaena* PCC7120 y su relación con el metabolismo del nitrógeno

Las proteínas FUR (Ferric uptake regulator) son una familia de reguladores transcripcionales que tradicionalmente ha sido asociada con la regulación de la homeostasis de metales. Estas proteínas se caracterizan por presentar un bajo peso molecular (entre 13 y 20 kDa) y por poseer dos dominios, un dominio de dimerización en la región carboxilo terminal y un dominio de unión a DNA en la región amino terminal, el cual presenta una estructura característica en forma de hélice-giro-hélice (47). Además contienen dos motivos característicos ubicados en la región carboxilo terminal, un motivo rico en histidinas y un motivo CXXC. Su nombre se debe a que el primer miembro de esta familia que se describió, la proteína Fur de *E.coli*, regulaba la homeostasis y captación de hierro (48). No obstante posteriormente se han identificado otros miembros de esta familia, implicados en la homeostasis del zinc (Zur), del manganeso (Mur), del níquel (Nur), y también capaces de responder a otros estímulos, como la disponibilidad de hemo (Irr) o el estrés oxidativo (PerR) (49).

Las proteínas de la familia FUR normalmente se unen al DNA en forma de homodímeros y presentan entre uno y tres sitios de unión a metal, que puede tener funciones estructurales o reguladoras (50). El metal estructural suele ser Zn^{2+} y es necesario para el mantenimiento de una conformación adecuada, aunque en algunas proteínas de esta familia no está presente. Su sitio de unión se encuentra en la región carboxilo terminal y normalmente implica cuatro cisteínas de dos motivos CXXC. Por su parte el metal regulador es aquel cuya homeostasis está regulada por la proteína y suele unirse en la región que separa ambos dominios.

Generalmente actúan como represores transcripcionales dependientes de la presencia del metal regulador, lo que les permite controlar la homeostasis del metal (51). Si el metal cuya homeostasis regulan es abundante, las proteínas Fur utilizando el metal como correpresor se unen al DNA en forma de dímero e impiden la transcripción de los genes que regulan. Por el contrario, en escasez de este metal, Fur libera el metal correpresor y deja de reprimir la transcripción, de modo que las regiones promotoras de los genes quedan accesibles.

2.4.1. Proteínas Fur en *Anabaena* PCC7120

La cianobacteria *Anabaena* PCC7120 presenta tres parálogos de proteínas Fur, denominadas FurA (*all1691*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*).

FurA es la que presenta mayor similitud con las proteínas Fur de heterótrofos. Consta de 151 aminoácidos y presenta el motivo rico en histidinas característico de las proteínas Fur y cinco residuos de cisteína, cuatro dispuestos en dos motivos CXXC y uno aislado. En la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, FurA no solo ejerce un control transcripcional sobre procesos relacionados con la homeostasis del hierro, como la captación de este metal y su almacenamiento, sino que se ha propuesto que actúa como un regulador global, participando en la regulación de procesos como el metabolismo del nitrógeno, la fotosíntesis o la morfología celular (52,53). También es capaz de unirse a su propio promotor y a los de los promotores de FurB y FurC, requiriendo en todos los casos condiciones reductoras y la presencia del hierro como metal correpresor (54,55). Además se ha propuesto que podría actuar como una proteína sensora, pues se ha descrito que está regulada a nivel transcripcional por el grupo hemo, el cual impide su unión al DNA, y presenta actividad disulfuro reductasa, lo que le permitiría responder a cambios en la homeostasis redox del citosol (56–58).

FurB consta de 132 aminoácidos y presenta 5 residuos de cisteína, de los cuales, al igual que sucedía en FurA, cuatro forman parte de dos motivos CXXC y uno está aislado. FurB ha sido descrito como el regulador Zur de *Anabaena* PCC7120, siendo por tanto responsable de modular la homeostasis de zinc al controlar la transcripción de genes que regulan la captación y almacenamiento de este metal (59). Además se ha determinado que esta proteína está implicada en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo, pues regula la expresión de genes como la superóxido dismutasa o la peroxirredoxina y se ha descrito que puede unirse al DNA de forma inespecífica, protegiéndolo de la degradación por radicales hidroxilo (60,61). Al igual que sucede con FurA, es capaz de regular su propia expresión y las de las otras proteínas Fur, siendo necesaria en todos los casos la presencia de condiciones reductoras y del metal correpresor, que en este caso es zinc, para la unión a sus promotores diana (54).

FurC es la proteína Fur de *Anabaena* PCC7120 que menor similitud presenta con las proteínas Fur descritas hasta la fecha y la más desconocida dentro de la familia. Consta de 149 aminoácidos y, aunque presenta 3 residuos de cisteína, ninguno de ellos forma parte de un motivo CXXC. A diferencia de lo que sucede con FurA y FurB, FurC no es capaz de unirse a los promotores de las proteínas Fur en las condiciones en las que el regulador es activo, es decir, en presencia de hierro como metal correpresor y en condiciones reductoras (54). No obstante, se ha propuesto que FurC podría actuar como un regulador de reguladores, pues se han llevado a cabo ensayos de retardo en gel que han demostrado que FurC aumenta la actividad de unión al DNA de FurA y disminuye la de FurB a sus propios promotores (54). FurC también ha sido propuesto como el regulador PerR de *Anabaena* PCC7120, pues su expresión aumenta en condiciones de estrés oxidativo y puede sensar el peróxido de hidrógeno a través de una oxidación catalizada por metal, lo que hace que el regulador se inactive y se expresen genes de respuesta a estrés oxidativo como la peroxirredoxina (62). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que podría regular otros procesos como la división celular o la fotosíntesis (63).

De estos tres parálogos de proteínas Fur, FurA y FurC han sido asociados con la regulación del metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias, tal y como se describe a continuación.

2.4.2. Papel de FurA en el metabolismo del nitrógeno

FurA ejerce un papel importante en el metabolismo del nitrógeno y la diferenciación de heterocistos pues regula la expresión genes como *abp1*, que codifica para un regulador transcripcional que se ha propuesto que podría controlar la expresión de *hepC* y con ello la síntesis de la envuelta de polisacáridos del heterocisto; *hetC*; *patA*; el regulador negativo de la diferenciación de heterocistos *asr1734* o *ccbP*, que codifica para una proteína de unión a calcio cuya expresión disminuye en los proheterocistos ocasionando un aumento en la concentración intracelular de calcio (53,64,65). Además se ha descrito que FurA actúa como represor transcripcional del regulador clave del metabolismo del nitrógeno NtcA. De hecho, en una estirpe de sobreexpresión de FurA no se produce la inducción en la expresión de *ntcA* que da lugar al heterocisto, inhibiéndose su desarrollo en etapas tempranas (66). Recíprocamente, NtcA también controla la expresión de *furA*, de modo que *furA* se induce en los proheterocistos durante las primeras 15 horas en ausencia de una fuente de nitrógeno combinado y permanece expresada de forma estable en los heterocistos maduros (67). En base a estos resultados se propuso que FurA podía actuar como una señal de parada en la inducción de *ntcA*, disminuyendo su expresión en los estadios tardíos de la diferenciación de heterocistos (66).

2.4.3. Papel de FurC en el metabolismo del nitrógeno

Al igual que FurA, FurC también parece estar involucrado en la regulación del metabolismo del nitrógeno aunque su papel está aun por determinar. Previamente, se ha descrito que la expresión de FurC está regulada de forma directa por NtcA ya que en una cepa de *Anabaena* PCC7120 que sobreexpresaba NtcA, se producía un aumento de la transcripción de FurC (68). Además esa regulación se lleva a cabo de manera directa ya que NtcA era capaz de unirse *in vitro* a la región promotora de FurC (69).

2.5. Interés del trabajo

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos y algunas especies, como *Anabaena* PCC7120, son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Esto implica que con unas pocas sales minerales pueden no solo alcanzar una gran biomasa, sino aportar a los ecosistemas una considerable cantidad de nitrógeno, el nutriente más escaso en la naturaleza y costoso desde el punto de vista económico y medioambiental en agricultura (5). Por ello tienen un amplio potencial en agricultura sostenible como biofertilizantes, y también son prometedores candidatos a ser utilizados en biorremediación (70). Además son capaces de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios de interés, como vitaminas o fármacos, y son una fuente muy relevante de compuestos bioactivos, cuya síntesis está íntimamente relacionada con el metabolismo del nitrógeno (70). Asimismo, las cianobacterias también permiten la obtención de biocombustibles, pues durante el proceso de fijación de nitrógeno se genera hidrógeno como producto secundario, el cual supone una alternativa a los combustibles fósiles que no emite CO₂ durante su combustión (5).

Por estas razones, conocer la regulación del metabolismo del nitrógeno en cianobacterias es de gran interés, pues no solo permite comprender mejor su fisiología sino que también permite mejorar su potencial biotecnológico. Identificar los reguladores transcripcionales que controlan tanto el metabolismo como la fijación de nitrógeno permitiría realizar modificaciones genéticas encaminadas a mejorar su capacidad de biofertilización, potenciar selectivamente la síntesis de compuestos de interés o incrementar la producción de biocombustibles. Sin embargo todavía existen muchas incógnitas sobre cómo las cianobacterias regulan estos procesos y cómo actúan las señales que los controlan y el interés de este trabajo es que puede aportar información al respecto, pues parece que las proteínas Fur podrían desentrañar papeles muy importantes.

3. Hipótesis y objetivos del estudio

3.1. Hipótesis de trabajo

La hipótesis de partida es que además de FurA el regulador transcripcional FurC también podría jugar un papel crucial en la regulación del metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120. FurA está descrito como regulador global, responsable de un “*cross-talk*” entre el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del hierro (69), e implicado en la diferenciación de heterocistos (66). En este estudio se propone que FurC también es un regulador global y controla la expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y la formación de heterocistos. Por otra parte se plantea si FurC y FurA podrían sensor el balance carbono/nitrógeno a través de su interacción con 2-oxoglutarato.

3.2. Objetivos del estudio

El propósito de este trabajo es conocer el papel que FurC desempeña en el metabolismo de nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 y determinar si las proteínas Fur implicadas en la respuesta a la deficiencia de nitrógeno actúan como sensores del balance carbono/nitrógeno. Así, se establecen los siguientes objetivos:

- Analizar los datos del transcriptoma de una estirpe de sobreexpresión de FurC en relación con la estirpe silvestre, en condiciones de deficiencia de nitrógeno.
- Estudiar los cambios transcripcionales observados en genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno en la estirpe de sobreexpresión de FurC mediante Real Time RT-PCR.
- Comprobar mediante ensayos de retardo en gel si los cambios observados en genes implicados en el metabolismo del nitrógeno se deben a una regulación directa por FurC.
- Estudiar la morfología y algunas respuestas fisiológicas de la estirpe de sobreexpresión de FurC en deficiencia de nitrógeno.
- Determinar si FurA y FurC son capaces de sensor el balance carbono/nitrógeno a través de la interacción con 2-oxoglutarato.

4. Materiales y métodos

4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

4.1.1. Cianobacterias

4.1.1.1. Cepas de cianobacterias

Las cepas de cianobacterias empleadas en este estudio se recogen en la tabla 1. *Anabaena* PCC7120 (*Nostoc* PCC7120) es una cianobacteria filamentosa capaz de fijar nitrógeno procedente de la Colección de Cultivos de Cianobacterias del Instituto Pasteur (71) mientras que la cepa EB2770FurC es una estirpe obtenida a partir de la anterior que sobreexpresa el regulador transcripcional FurC (*alr0957*) (63,72).

Cepa	Características	Origen
<i>Anabaena</i> PCC7120	Estirpe wild type (silvestre)	Instituto Pasteur, París
EB2770FurC	<i>Anabaena</i> PCC7120 conteniendo el plásmido pAM2770/ <i>furC</i> (sobreexpresa FurC). Resistente a neomicina a una concentración de 50 µg/mL	Sevilla et al., 2019

Tabla 1. Cepas de cianobacterias utilizadas en el estudio

4.1.1.2. Condiciones de cultivo

Anabaena PCC7120 se cultivó en medio BG-11 estéril, cuya composición es 1,35 g/L de NaNO₃, 0,738 g/L de NaHCO₃, 0,04 g/L de K₂HPO₄ · 3 H₂O, 0,036 g/L de CaCl₂ · 2 H₂O, 0,075 g/L de MgSO₄ · 7 H₂O y 0,02 g/L de Na₂CO₃ suplementado con 1 mL de solución de micronutrientes de composición 6 g/L de citrato férrico amónico, 6 g/L de ácido cítrico, 1 g/L de EDTA, 2,86 g/L de H₃BO₃, 1,81 g/L de MnCl₂ · 4 H₂O, 0,22 g/L de ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,39 g/L de Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0,079 g/L de CuSO₄ · 5 H₂O y 0,0494 g/L de CoCl₂ por cada litro de solución basal (73). El medio de cultivo se preparó con agua destilada sin ajustar pH, se esterilizó en autoclave y se conservó a 4 °C en oscuridad. La estirpe EB2770FurC se cultivó en medio BG-11 suplementado con 50 µg/mL de neomicina, para lo cual se añadió al medio BG-11 un 1 % (v/v) de una solución de neomicina a 50 mg/mL esterilizada por filtración.

Las estirpes de cianobacterias inicialmente se crecieron en medio líquido, en un frasco Roux de 1 L burbujeado con aire estéril (filtrado con un filtro de 0,22 µm) para una adecuada agitación y aireación. Se mantuvieron a una temperatura de 25-30 °C, con luz lateral de una intensidad de 20 µmol de fotones m⁻² s⁻¹. A partir de estos cultivos se inocularon los utilizados en cada experimento concreto.

Para iniciar los cultivos anteriores se partió de cultivos en medio sólido, que se llevaron a cabo en placas Petri conteniendo medio BG-11 suplementado con agarosa al 1 % (p/v) en el caso de la estirpe silvestre o medio BG-11 suplementado con 50 µg/mL de neomicina y agarosa al 1 % (p/v) en el caso de la cepa *Anabaena* EB2770. Las placas se incubaron a 25-30 °C con una intensidad de luz de 5 µmol de fotones m⁻² s⁻¹.

4.1.1.3. Estudio de la respuesta de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno

Para estudiar la respuesta de las cepas de cianobacterias descritas en la sección 4.1.1.1. a la deficiencia de nitrógeno las células se cultivaron en medio BG-11 carente de NaNO_3 en el caso de la estirpe silvestre y medio BG-11 carente de NaNO_3 y suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de neomicina en el caso de la cepa EB2770FurC. Se partió de cultivos en suficiencia de nitrógeno a una densidad óptica a 750 nm de 1,0, cultivados como se recoge en la sección 4.1.1.2., y se hicieron tres lavados con medio BG-11 carente de NaNO_3 . Para ello las células se centrifugaron 5 min a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C en una centrífuga Allegra X 30R, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en el mismo volumen de medio BG-11 carente de NaNO_3 .

Los estudios se realizaron en cultivos en medio líquido empleando erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de cultivo a una densidad óptica a 750 nm comprendida entre 0,25-0,3 y se mantuvieron con una intensidad de luz constante de 20 $\mu\text{mol fotones s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y una temperatura constante de 27 °C en un incubador orbital Innova 43[®] a 100 rpm.

4.1.2. *Escherichia coli*

4.1.2.1. Cepas de *E. coli*

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo se recogen en la siguiente tabla:

Cepa	Genotipo	Empleo	Origen
DH5 α	F ⁻ , U169 ($\Phi 80\Delta lacZ\Delta M15$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> λ^- , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$	Conservación de plásmidos	Invitrogen
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Sobreexpresión de proteínas	Novagen
DH5 α pET <i>furA</i>	DH5 α conteniendo el plásmido pET-28a/ <i>furA</i> . Resistente a kanamicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$	Conservación del plásmido pET-28a/ <i>furA</i>	Tesis doctoral Cristina Sarasa
DH5 α pET <i>furC</i>	DH5 α conteniendo el plásmido pET-28a/ <i>furC</i> . Resistente a kanamicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$	Conservación del plásmido pET-28a/ <i>furC</i>	Tesis doctoral Cristina Sarasa

Tabla 2. Cepas de *E. coli* empleadas en el estudio

4.1.2.2. Condiciones de cultivo

El cultivo de cepas de *E. coli* se llevó a cabo empleando el medio de cultivo Luria Bertani (LB) (74), compuesto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de cloruro de sodio, que se preparó con agua destilada y se esterilizó en un autoclave.

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en medio LB y se incubaron a 37 °C con agitación continua a 200 rpm en un incubador orbital Sanyo. Por su parte los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo a 37 °C en placas Petri utilizando el medio LB suplementado con agar al 1,5 % (p/v). La selección en el medio de cultivo líquido o sólido se realizó mediante la adición previa de kanamicina a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ a partir de un stock 1000 veces concentrado disuelto en agua destilada y esterilizado por filtración con filtros de 0,22 μm .

4.2. Aislamiento y análisis de DNA

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

La extracción de plásmidos conservados en cepas de *E. coli* se realizó con el Kit GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La determinación de la concentración del plásmido extraído se llevó a cabo mediante un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

4.2.2. Extracción de DNA genómico de *Anabaena PCC7120*

El DNA genómico de *Anabaena PCC7120* fue empleado en este trabajo para amplificar diversos promotores de interés. Para su extracción se siguió la siguiente metodología.

Se tomaron 50 mL de un cultivo de *Anabaena PCC7120* en fase exponencial de crecimiento y se centrifugaron en un tubo Falcon durante 5 min a 4000 rpm (3082 x g) en una centrífuga Allegra X 30R. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen restante, que se pasó a tubos eppendorf de 2 mL con tapón de seguridad. Estos tubos se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se eliminó el sobrenadante en su totalidad y el pellet se resuspendió en 400 µL de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM. Se añadieron 20 µL de SDS 10 % (p/v), 450 µL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y 3 puntas de espátula de perlas de vidrio y a continuación, se realizaron cuatro ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex seguido por 1 minuto de reposo en hielo para romper las células.

Tras la lisis celular los tubos eppendorf se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5427R y se transfirió la fase acuosa a tubos eppendorf nuevos. Las células se lavaron con 1 volumen de fenol, 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y dos veces con 1 volumen de cloroformo, descartando en todos los lavados la fase orgánica inferior. Se añadieron a la última fase acuosa 1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó la mezcla durante 2 h a -80 °C para precipitar el DNA. Transcurrido ese tiempo los tubos eppendorf se centrifugaron durante 15 min a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5427R y se eliminó el sobrenadante en su totalidad. El precipitado se lavó con etanol al 70 % (v/v) frío y se resuspendió en 30 µL de agua miliQ estéril. Finalmente se cuantificó el DNA cromosómico obtenido empleando un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare) y se comprobó su identidad mediante una electroforesis en gel de agarosa (sección 4.2.5.).

4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se utilizó para amplificar los promotores de interés a partir de DNA genómico de *Anabaena PCC7120*. Cada mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 100 µL y contenía 72 µL de agua miliQ estéril, 10 µL de Buffer 10x (Tris-HCl 75 mM pH 9,0, KCl 50 mM y (NH₄)₂SO₄ 20 mM), 3 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL de mezcla de dNTPs 10 mM, 2,5 µL de cebador directo 20 µM, 2,5 µL de cebador reverso 20 µM, 1 µL de Taq DNA polimerasa 1 U/µL (Biotools) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). El programa mediante el cual se llevó a cabo la PCR y los oligonucleótidos utilizados se recogen en las secciones 8.1 y 8.2 de Material Suplementario, respectivamente.

4.2.4. Purificación y cuantificación de los productos de PCR

La correcta amplificación y ausencia de productos inespecíficos en las reacciones de PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 4.2.5.) Los productos de PCR se purificaron empleando el kit GFX™ PCR DNA and Gel band Purification (GE Healthcare) para eliminar los reactivos sobrantes de la PCR, principalmente los oligonucleótidos y dNTPs, que podrían interferir en etapas posteriores del trabajo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración de los productos de PCR empleando un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare).

4.2.5. Electroforesis de DNA

Para comprobar la integridad del DNA genómico, así como la correcta amplificación y ausencia de contaminantes en las reacciones de PCR se llevó a cabo una electroforesis del DNA en gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 1 % (p/v) con un 1% (v/v) de bromuro de etidio, para lo cual se disolvieron 50 g de agarosa en 50 mL de tampón TBE (Tris-HCl 90 mM pH 8, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM) por calentamiento en un horno microondas, se dejó enfriar y antes de su solidificación se añadieron 50 µL de bromuro de etidio 0,5 g/mL. Para realizar la electroforesis de DNA se tomaron 4 µL de la muestra a analizar, que se mezclaron con 3 µL de tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, 30 % (v/v) de glicerol y 0,25 % (p/v) de azul de bromofenol) y se cargaron en el gel de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE a 90 V durante 25 min utilizando una fuente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizaron con un equipo GelDoc200 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1 (BioRad Laboratories, 1997).

4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias

4.3.1. Precauciones durante el trabajo con RNA

Durante el trabajo con RNA es fundamental tener en cuenta la presencia de ribonucleasas (RNAsas), que son enzimas muy estables, activas y ubicuas capaces de degradar rápidamente el RNA aunque se encuentren en pequeñas cantidades. Las RNAsas pueden ser endógenas, aquellas liberadas por las cianobacterias tras la lisis celular, o exógenas, es decir, procedentes del ambiente o del investigador. Por ello es importante trabajar en condiciones asépticas y tomar una serie de precauciones para evitar la degradación del RNA. Todas las etapas se llevaron a cabo empleando agua y reactivos sólidos libres de RNAsas, así como puntas de micropipeta con filtro. El material y las soluciones empleadas se autoclavaron antes de su uso y la campana extractora, los guantes, las pipetas y la superficie de trabajo se lavaron con NaOH 0,4 M.

4.3.2. Toma de muestras para aislamiento de RNA de cianobacterias

Para llevar a cabo el aislamiento de RNA se tomaron muestras de los cultivos de cianobacterias lo más rápidamente posible para que no cambiara la población de RNAs. Se centrifugaron 25 mL de cultivo a 4500 rpm (3900 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen restante, que se pasó a un eppendorf de 2mL con tapón de seguridad y libre de RNAsas. A continuación estos tubos se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se eliminó el sobrenadante en su totalidad y se añadieron 600 µL de tampón de recogida

(Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 100 mM) y 130 μ L de cloroformo, invirtiendo los tubos 4 veces y dejándolos reposar 3 min en baño de hielo. Finalmente los tubos se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R obteniendo tres fases: una superior acuosa, una intermedia formada por las células y una orgánica inferior que contiene el cloroformo. Tras descartar la fase acuosa superior se atravesó la fase intermedia con la pipeta para eliminar la fase orgánica inferior, congelando las muestras en N₂ líquido y conservándolas a -80 °C hasta su posterior uso.

4.3.3. Extracción del RNA

Para extraer el RNA las muestras anteriores se descongelaron y se añadieron 300 μ L de tampón de resuspensión (sacarosa 0,3 M, acetato de sodio 10 mM pH 4,5), 100 μ L de disolución EDTA disódico 250 mM pH 8, 400 μ L de tampón de lisis (2 % (p/v) de SDS, 10 mM de acetato de sodio pH 4,5) y 1 mL de fenol ácido a 65 °C. Los tubos se agitaron durante 30 s en vortex y se incubaron durante 2,5 min a 65 °C, repitiendo tres veces estas dos últimas operaciones.

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se transfirió la fase acuosa superior a otro eppendorf, añadiendo 1 mL de trizol. Los tubos se agitaron durante 30 s en vortex, se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 μ L de cloroformo a cada tubo. A continuación se agitó en vortex durante 30 s, dejando reposar a temperatura ambiente durante 1 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g), a 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, transfiriendo 750 μ L de la fase acuosa a otro eppendorf.

Tras añadir un volumen de cloroformo, se agitó en vortex durante 30 s y se centrifugaron los tubos 5 min a 12000 rpm (16260 x g) en una centrífuga Eppendorf 5427R, transfiriendo la fase acuosa a otro eppendorf, repitiendo dos veces esta última serie de etapas. Por último se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto preenfriado, se agitó en vortex durante 30 s y se guardaron las muestras a -80 °C hasta su posterior uso.

Puesto que las muestras anteriores contienen DNA genómico además de RNA se realizó un tratamiento con DNasaI. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 30 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μ L de etanol al 70 % (v/v), preenfriado a -20 °C. A continuación se centrifugaron las muestras a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. Se descartó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente durante 1 h para evaporar el etanol. Por último el pellet se resuspendió en 90 μ L de agua libre de RNasas.

4.3.4. Tratamiento con DNasaI

Se añadieron 10 μ L de buffer DNasa y 2 μ L de DNasaI libre de RNasas a los 90 μ L de solución de RNA. El volumen resultante se pasó a tubos de PCR, que se incubaron en un termociclador durante 70 min a 37 °C y después a 65 °C durante 10 min para inactivar la enzima. El RNA extraído se conservó a -80 °C hasta su uso.

4.3.5. Gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA

Se tomaron 2 μL de los RNAs extraídos, se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga (Tris 50 mM pH 8, 30 % (v/v) de glicerol y 0,25 % (p/v) de azul de bromofenol), se cargaron en un gel de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TBE ((Tris-HCl 90 mM pH 8, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM) con 0,1 % (v/v) de bromuro de etidio y se sometieron a electroforesis para comprobar su integridad. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 min utilizando una fuente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizaron como se describe en la sección 4.2.5.

4.3.6. Cuantificación del RNA

La concentración y pureza de los RNAs aislados se determinaron mediante espectrofotometría, empleando un espectrofotómetro SPECORD® PLUS. Se utilizaron cubetas de cuarzo, que se lavaron con NaOH 0,4 M y se aclararon con agua libre de RNAsas, y se realizó una línea base entre 250 y 600 nm con agua libre de RNAsas. A continuación se añadieron 390 μL de agua libre de RNAsas a la cubeta de cuarzo y 10 μL del RNA correspondiente y se mezclaron invirtiendo las cubetas 4 veces. Se registraron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm corresponde al máximo de absorción de los ácidos nucleicos mientras la absorbancia a 280 nm corresponde al máximo de absorción de los aminoácidos aromáticos y por tanto permite calcular la pureza de la muestra en cuanto a la presencia de proteínas. Si el ratio $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ está comprendido entre 1,8 y 2,0 la muestra presenta una alta pureza en RNA. La concentración de cada una de las muestras de RNA se calculó teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm para el ssRNA corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.3.7. Comprobación de la pureza del RNA aislado

Aunque las muestras habían sido tratadas con DNAsas, era posible que el RNA obtenido estuviera contaminado con DNA, por lo que antes de la retrotranscripción se decidió determinar la presencia de DNA en las muestras de RNA mediante RT-PCR a tiempo real (Real Time RT-PCR).

Se estimó que la concentración media de RNA era de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$, de modo que se tomaron 2,5 μL de RNA y se mezclaron con 500 μL de agua libre de RNAsas para tener una concentración final de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y así determinar si a esa concentración de muestra, que será similar a la de la retrotranscripción, hay restos de DNA no procedentes de la retrotranscripción que pudieran interferir en la medición de la expresión de los genes.

Se preparó una mezcla de reacción con el gen de referencia *mnpB*, un gen constitutivo, para detectar la presencia de DNA en la muestra. Esta mezcla de reacción se componía de 12,5 μL /pocillo de SyBr® Green Dye, 0,2 μL /pocillo de primer directo de *mnpB*, 0,2 μL /pocillo de primer reverso de *mnpB* y 7,1 μL /pocillo de agua libre de RNAsas. Se mezclaron 20 μL de la mezcla anterior con 10 μL de la dilución correspondiente en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se llevó a cabo la amplificación del DNA mediante en un equipo Viia TM 7 Real Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando SyBr® Green Dye.

4.3.8. Retrotranscripción

Se llevó a cabo una retrotranscripción del RNA aislado para obtener cDNA complementario al RNA, empleando ‘SuperScript Reverse Transcriptase[®]’ de GibcoBRL. Se añadieron en un tubo de PCR 2 µg de RNA, 1 µL de solución de ‘random primers’ (300 ng/µL), 2 µL de tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y KCl 150 mM) y se completó el volumen hasta 20 µL con agua libre de RNasas. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 min a 85 °C, se hibridaron los ‘random primers’ durante 60 min a 50 °C y a continuación se añadieron a cada tubo 2 µL de mezcla de dNTPs 10 mM, 4 µL de DTT 0,1 M, 8 µL de tampón de retrotranscripción 5x, 5 µL de agua libre de RNasas y 1 µL de SuperScript Reverse Transcriptase[®] 200 U. La mezcla se incubó durante 60 min a 47 °C para que se produjera la extensión de los cebadores y durante 15 min a 75 °C para detener la reacción, conservando las muestras a 4 °C

4.3.9. Estudios de expresión génica mediante Real Time RT-PCR

Para analizar los cambios en la expresión génica se empleó la Real Time RT-PCR, en la que se cuantificaron los transcritos de interés retrotranscritos a cDNA y se normalizaron respecto al gen constitutivo *mpB*. Para llevar a cabo la Real Time RT-PCR se preparó una mezcla de reacción para cada gen de estudio compuesta de 12,5 µL/pocillo de SyBr[®] Green, 7,1 µL/pocillo de agua libre de RNasas, 0,2 µL/pocillo de primer reverso 25 mM y 0,2 µL/pocillo de primer directo 25 mM y se añadieron en cada pocillo 20 µL de mezcla de reacción y 10 µL del cDNA de interés diluido 50 veces en agua libre de RNasas, pues las rectas patrón de los genes de interés mostraron que esta dilución era apropiada para estudiar cambios en la expresión de estos genes. El programa mediante el cual se llevó a cabo la Real Time RT-PCR, el tratamiento matemático de los datos y los oligonucleótidos utilizados se reflejan en las secciones 8.3 y 8.4 de Material Suplementario.

4.4. Métodos genéticos

La introducción de material genético en células de *E. coli* requiere que estas células se encuentren en un estado de competencia. En este trabajo se prepararon células de *E. coli* termocompetentes que se transformaron mediante choque térmico y se emplearon para el almacenamiento de vectores plásmidicos o para la sobreexpresión de proteínas recombinantes.

4.4.1. Preparación de células de *E.coli* termocompetentes

Para obtener las células de *E.coli* termocompetentes se inoculó una colonia de *E. coli* BL21 en 10 mL de medio líquido LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se inocularon 200 mL de medio LB con 2 mL del cultivo anterior y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm comprendida entre 0,3 y 0,4. Una vez alcanzado ese valor de densidad óptica se incubó el cultivo durante 20 minutos en hielo para detener el crecimiento y posteriormente se dividió en cuatro tubos falcon de 50 mL, que se centrifugaron durante 15 min a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C en una centrífuga Allegra X 30R. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1 mL de *buffer 1* (CaCl₂ 0,13 M, MgCl₂ 0,15 M y acetato sódico 0,04 M) estéril y frío. A continuación los tubos falcon se volvieron a centrifugar durante 15 min a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C en una centrífuga Allegra X 30R y se descartó el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en 4 mL de *buffer 2* (CaCl₂ 0,13 M, glicerol 15 % (v/v)) estéril y frío y se repartieron en tubos eppendorf estériles en alícuotas de 200 µL, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

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

Para introducir los plásmidos de interés en las células termocompetentes se descongelaron las alícuotas necesarias de células termocompetentes en un baño de hielo durante 30 min. A continuación se añadieron en esterilidad 100 ng del DNA plasmídico de interés, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se aplicó a las células el choque térmico a 42 °C durante 1 minuto empleando un termobloque e inmediatamente se transfirieron a un baño de hielo, donde se incubaron durante 2 minutos. Posteriormente se añadieron 800 µL de medio LB estéril sin antibiótico y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C y 200 rpm. Finalmente se sembró el cultivo en una placa de LB agar con el antibiótico adecuado empleando un asa de siembra y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

4.5 Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes

Un procedimiento habitual para la obtención de proteínas consiste en su sobreexpresión en un sistema heterólogo y posterior purificación empleando un procedimiento adecuado. En este trabajo se han sobreexpresado y purificado las proteínas FurA y FurC de *Anabaena* PCC7120, empleando *E. coli* como sistema heterólogo para su sobreexpresión.

4.5.1. Prueba de sobreexpresión

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) termocompetentes se transformaron con el plásmido pET-28a/*furA* en el caso de la purificación de FurA o con el pET-28a/*furC* en el caso de la purificación de FurC como se describe en el apartado 4.4.2. En primer lugar, antes de proceder a la producción de biomasa, se realizó una prueba de sobreexpresión a pequeña escala. Para cada una de las dos transformaciones se seleccionaron 4 colonias y se inocularon en tubos falcon de 10 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, realizando réplicas en placas de LB agar con 50 µg/mL de kanamicina para disponer de ellas una vez que se sepa cual sobreexpresa más. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 200 rpm durante toda la noche y se refrescaron añadiendo 100 µL de cultivo en 10 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. Estos cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5 (aproximadamente 2-3 horas) y se dividieron los 10 mL de cada uno de los cultivos en dos tubos falcon, uno de los cuales se indujo añadiendo 5 µL de IPTG 1 M para tener una concentración final de 1 mM. Finalmente los 8 falcon (4 inducidos y 4 sin inducir) se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 3 horas para permitir la sobreexpresión de la proteína.

Para comprobar cuál de las cuatro colonias presenta una mayor sobreexpresión de la proteína se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para ello se tomó 1 mL de cada cultivo en un tubo eppendorf, que se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm (16260 x g) en una centrífuga Eppendorf 5427R. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 75 µL de agua miliQ y 15 µL de tampón de carga 6x (60 mM de Tris-HCl pH 6,8, 9,6 % (p/v) de SDS, 42 % (v/v) de glicerol, 0,06 % (p/v) de azul de bromofenol y 30 % (v/v) de β-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron durante 5 min a 95 °C, se centrifugaron 5 minutos a 12000 rpm (16260 x g) en una centrífuga Eppendorf 5427R y se cargaron 10 µL de sobrenadante en un gel de SDS. La electroforesis se llevó a cabo como se describe en la sección 4.6.1, lo que permitió determinar cuál de las cuatro colonias mostraba un mayor nivel de expresión de la proteína.

4.5.2. Obtención de biomasa e inducción de la sobreexpresión

Una vez que se determinó cuál de las cuatro colonias seleccionadas mostraba un mayor nivel de expresión se pasó a obtener biomasa en gran cantidad. Para ello se seleccionó para cada una de las dos proteínas la colonia de mayor expresión y se inocularon tubos falcon con 10 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina con la réplica de esa colonia que se tiene en la placa de LB agar. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche y se refrescaron en erlenmeyers con 1 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. Los erlenmeyers se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5, momento en el que se indujo la expresión de la proteína añadiendo 1 mL de IPTG 1 M a cada uno de los erlenmeyers, de modo que la concentración final fuera de 1 mM. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 3 horas para permitir la expresión de las proteínas recombinantes y una vez transcurrido ese tiempo se centrifugaron en una centrifuga Beckman a 8000 rpm (11000 x g) y 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se recogió el pellet de células, que se congeló a -20 °C hasta su uso.

4.5.3. Lisis celular

Antes de purificar las proteínas a partir de la biomasa obtenida es necesario lisar las células para que liberen su contenido. En este trabajo las células se lisaron mediante sonicación para lo cual se descongelaron 10 gramos de biomasa, que se resuspendieron en 50 mL del tampón de purificación correspondiente (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, 2M de cloruro de guanidinio pH 8 para FurA y 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 7,5 para FurC) suplementado con 500 µL de PMSF 100 mM, de modo que la concentración final fue de 1 mM. Las células se rompieron por sonicación con 10 ciclos de 45 s a amplitud del 80 % y ciclo 0,5 y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher[®], con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. La suspensión de células rotas se centrifugó en una centrifuga Beckman a 10000 rpm (12000 x g) y 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,22 µm, conservándose en frío hasta la purificación.

4.5.4. Purificación de FurA

La proteína FurA se purificó a partir del extracto protéico correspondiente mediante cromatografía de afinidad a un ion metálico (IMAC, immobilized metal affinity chromatography) empleando la matriz *Chelating Sepharose Fast Flow* (75). Para ello se aplicó la matriz sobre la columna de cristal y se empaquetó primero por gravedad y luego con agua mili Q a un flujo de 5-10 mL/min hasta conseguir 10 mL de resina empaquetada. A continuación, para eliminar el etanol en el que está preservada la matriz, se lavó la resina con 10 volúmenes de agua miliQ a 3 mL/min, velocidad que se empleó a lo largo del protocolo de purificación. Se aplicaron 3 volúmenes de ZnSO₄ 0,25 M para cargar la columna con el metal, se aplicaron 5 volúmenes de agua miliQ para eliminar el exceso de metal no adherido y se aplicaron 5 volúmenes de tampón de purificación (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, 2 M de cloruro de guanidinio, pH 8) para equilibrar la columna.

Una vez preparada la columna con el metal al que se va a unir la proteína se aplicó el extracto a la columna con una velocidad de 3 mL/min, colectando y guardando la totalidad del volumen muerto para verificar que la proteína no se encontraba en esta fracción. Se aplicó el tampón de lavado (35 mM de glicina en tampón de purificación) hasta que la densidad óptica a 280 nm del eluido fue menor a 0.1, lo que permite eluir las proteínas unidas a la columna con baja afinidad, ya que la glicina compite con éstas por los iones metálicos. A continuación se eluyó la proteína de interés usando 60 mL de un gradiente creciente de imidazol (0-1 M), recogiendo el eluido en alícuotas de 1 mL que se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (sección 4.6.1.).

No obstante, puesto que las fracciones contienen cloruro de guanidinio, fue necesario llevar a cabo un paso previo de precipitación con TCA al 10 % (v/v) antes de cargarlas en el gel de SDS-PAGE. Para ello se mezclaron en un tubo eppendorf 15 µL de la muestra a analizar, 85 µL de agua miliQ y 100 µL de TCA 10 %. La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó 10 min a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5427R . Se descartó el sobrenadante, se añadieron 200 µL de acetona fría sobre el precipitado 200 µL y se centrifugó 10 min a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5427R . Tras eliminar el sobrenadante se dejó secar el precipitado durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos de acetona y transcurrido ese tiempo se resuspendió en 10 µL de agua miliQ y 2 µL de tampón de carga 6x (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 9,6 % (p/v) de SDS, 42 % (v/v) de glicerol, 0,06 % (p/v) de azul de bromofenol y 30% (v/v) de β-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron 5 minutos a 97 °C, se incubaron durante 1 minuto en hielo, se centrifugaron 5 min a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5427R y se cargaron 15 µL del sobrenadante en el gel de electroforesis SDS-PAGE.

De esta manera se determinó qué fracciones contenían la proteína de interés en mayor cantidad o con mayor grado de pureza. La columna se regeneró pasando 5 volúmenes de agua miliQ, 0,5 volúmenes de Strip Buffer (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8), 3 volúmenes de NaCl 5 M, 5 volúmenes de agua miliQ y 5 volúmenes de etanol al 20 % (v/v).

Las alícuotas con mayor cantidad de proteína se combinaron y dializaron, para lo cual se sometieron a dos ciclos de diálisis en 3 L de tampón acético-acetato 10 mM, pH 5,5 a 4 °C. Finalmente se cuantificó la proteína espectrofotométricamente mediante la ley de Beer Lambert, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de FurA a 276 nm es de 13760 M⁻¹ cm⁻¹.

4.5.5. Purificación de FurC

La proteína FurC se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa a una temperatura de 4 °C para evitar la desnaturización de la proteína (63). Para ello se aplicó la matriz sobre la columna de cristal y se empaquetó primero por gravedad y luego con agua miliQ a un flujo de 5-10 mL/min hasta conseguir 18 mL de volumen empaquetado. A continuación, para eliminar el etanol en el que está preservada la matriz, se lavó la resina con 10 volúmenes de agua miliQ a 3 mL/min, velocidad que se empleó a lo largo del protocolo de purificación, y 5 volúmenes de tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5) para equilibrar la columna.

A continuación se aplicó el extracto a la columna con una velocidad de 2 mL/min, colectando el volumen muerto para verificar que la proteína no se encontraba en esta fracción. Se lavó la columna con 5 volúmenes de tampón de purificación y se eluyó la proteína de interés usando 100 mL de un gradiente creciente de NaCl (0-0,5 M) seguido de 5 volúmenes de tampón de elución (NaCl 0,5 M en tampón de purificación). El eluido se recogió en alícuotas de 1 mL que se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (sección 4.6.1.). Así se pudo ver qué fracciones contenían la proteína de interés en mayor cantidad o con mayor grado de pureza.

Las alícuotas en las que la proteína estaba más pura se combinaron y dializaron, para lo cual se sometieron a dos ciclos de diálisis en 3 L de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,5 a 4 °C. Finalmente se cuantificó la proteína espectrofotométricamente mediante la ley de Beer Lambert, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de FurC a 276 nm es de $13490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6. Técnicas analíticas de proteínas

En este trabajo se emplearon las siguientes técnicas analíticas para la caracterización de proteínas.

4.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

La electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se utilizó para analizar el nivel de expresión de las proteínas de interés en cada uno de los cultivos en la prueba de sobreexpresión, así como para analizar las fracciones resultantes de la purificación. Los geles se prepararon en un equipo Dual Gel Caster (GE Healthcare) y constaban de una región concentradora con un porcentaje del 5 % de acrilamida/bisacrilamida y una región separadora con un porcentaje del 17 % de acrilamida/bisacrilamida. La composición de los geles de poliacrilamida se recoge en la sección 8.5 de Material Suplementario.

Para la preparación de las muestras se tomaron 15 μL de muestra y se mezclaron con 3 μL de tampón de carga 6x, de modo que la composición final fue 10 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1,6 % (p/v) de SDS, 7 % (v/v) de glicerol, 0,01 % (p/v) de azul de bromofenol y 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. Estas muestras se calentaron 5 min a 95 °C para desnaturizar las proteínas y se centrifugaron 5 min a 12000 rpm ($16260 \times g$) en una centrífuga Eppendorf 5427R. Tras limpiar manualmente los pocillos del gel se cargaron 10 μL de sobrenadante cada uno de los pocillos y se llevó a cabo la electroforesis suministrando una corriente constante de 35 mA por gel durante 45 min, en un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM y SDS 3,5 mM. Para realizar la electroforesis se empleó un dispositivo de electroforesis vertical Mighty Small II SE250 / SE260 (Hoefer) junto con una fuente de corriente PowerPac Basic (Bio-Rad).

Para visualizar las proteínas, se tiñó el gel de poliacrilamida durante al menos 20 min con una disolución colorante compuesta por 10 % (v/v) ácido acético, 45 % (v/v) metanol, 45 % agua y 0,25 % (p/v) Coomassie Blue R-250. El colorante azul de Coomassie presenta una sensibilidad de 0,2-0,5 μg de proteína y se une de forma no covalente a residuos básicos e hidrofóbicos de la proteína. Para eliminar el exceso de colorante en el gel, se realizaron varios lavados con una disolución decolorante cuya composición era 10 % (v/v) ácido acético, 25 % (v/v) metanol y 65 % agua.

4.6.2. Calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC (Isothermal Titration Calorimetry) es una técnica biofísica que permite estudiar interacciones entre una proteína y un ligando en base al calor que se libera o se absorbe en la formación del complejo. El experimento se basa en la inyección de cantidades crecientes de ligando, que se encuentra en la jeringa del equipo, sobre la proteína, que se encuentra en la celda, y lo que se mide es el calor ($\mu\text{cal/s}$) que hay que aportar para mantener constante la diferencia de temperatura entre la celda que contiene la proteína y una celda de referencia que solo contiene tampón. Esto permite obtener una curva a partir de la cual pueden calcularse los parámetros termodinámicos de la interacción entre ambas biomoléculas.

En este estudio esta técnica se utilizó para analizar la interacción de las proteínas FurA y FurC con 2-oxoglutarato. Los ensayos se realizaron a 25 °C, con una concentración de proteína en la celda de 10 μM y con 100 μM de ligando (2-oxoglutarato) en la jeringa, el cual estaba disuelto en el mismo tampón en el que se encontraba la proteína. Cuando fue necesario se añadió 1 mM de DTT y/o 100 μM de MnCl_2 para comprobar su efecto sobre la interacción. Se empleó un calorímetro MicroCal Auto-iTC200 (Malvern -Panalytical) y el análisis de los datos se realizó con el programa ORIGIN-ITC (Microcal) mediante regresión no lineal.

4.7 Ensayos de retardo en gel (EMSA)

La unión *in vitro* de FurC y FurA a distintos fragmentos de DNA se analizó mediante ensayos de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA). Esta técnica se basa en la capacidad del regulador transcripcional de reconocer y unirse *in vitro* al DNA diana y formar un complejo DNA-proteína que muestra una migración retardada en una electroforesis nativa. Para demostrar que la unión del regulador transcripcional al DNA de interés era específica los ensayos se realizaron en presencia de un DNA competidor, en este caso un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*). Se emplearon geles de poliacrilamida no desnaturizantes al 6%, un grado de entrecruzamiento que permite la migración de los complejos DNA-proteína, que se prepararon en un equipo Dual Gel Caster (BioRad). Los geles se prepararon como se describe en la sección 8.6 de Material Suplementario y se precorrieron durante al menos 1 hora a 60 V y 4 °C en buffer 50 mM de Tris-HCl, 380 mM de glicina, pH 8. Este paso es crucial para eliminar restos de poliacrilamida y persulfato de amonio de los pocillos así como para equilibrar el gel en el tampón de electroforesis y conseguir que alcance una temperatura constante.

Las mezclas de reacción se prepararon mezclando distintas concentraciones de proteína con 50 ng del fragmento de DNA de interés, 50 ng del fragmento de DNA inespecífico (*ifpkn22*), 2 μL de tampón de unión (Bis-Tris 10 mM pH 7,5, KCl 40 mM, glicerol 5% (v/v)), 1 μL de albumina sérica bovina a 1 mg/mL, 1 μL de DTT 20 mM y 1 μL de MnCl_2 2 mM, completando el volumen hasta 20 μL con agua miliQ. Estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo se mezclaron con 3 μL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 30 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v)). Seguidamente se limpiaron los pocillos y se cargaron 20 μL de cada muestra, incluyendo un control negativo sin proteína. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V y 4 °C durante 110 min en tampón de electroforesis (50 mM Tris-HCl, 380 mM de glicina, pH 8). Los geles se tiñeron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de SyBr[®] Safe Fluorescent Dye durante 10 minutos en agitación y en oscuridad y se revelaron en un transiluminador BioRad Gel Doc 2000.

4.8. Aproximaciones bioquímicas y otras técnicas analíticas

En este trabajo se emplearon las siguientes aproximaciones bioquímicas y métodos analíticos. Para analizar si los cambios en los parámetros eran o no significativos se llevó a cabo un análisis estadístico tipo t-test utilizando el software GraphPad Prism 7.

4.8.1. Extracción de proteínas totales solubles

Para obtener los extractos de proteínas totales solubles de cultivos de cianobacterias se centrifugaron 5 mL de cultivo en un tubo Falcon a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R, se descartó el sobrenadante y el volumen restante se pasó a un tubo Eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 4000 rpm (1087 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el precipitado en 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 y se añadieron 10 µL de inhibidor de proteasas PMSF 100 mM para obtener una concentración final de 1 mM.

Las células se rompieron por sonicación con 5 ciclos de 45 s a amplitud del 80 % y ciclo 0,5 y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Por último la suspensión de células rotas se centrifugó a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se utilizaron 950 µL de sobrenadante para obtener el extracto de proteínas totales solubles.

4.8.2. Determinación de proteína total

La concentración de proteína total en los extractos de proteína total soluble procedentes de cultivos de cianobacterias se determinó mediante el método del BCA, siguiendo el protocolo de la casa comercial ThermoFisher. El método se basa en la reducción en medio alcalino del Cu^{2+} a Cu^+ por el enlace peptídico, de modo que los iones Cu^+ se unen al BCA cambiando su estructura electrónica y absorbiendo a 562 nm. Así, puesto que la absorbancia es proporcional a la concentración de proteínas, se puede determinar el contenido de proteína total midiendo la absorbancia a 562 nm, empleando una recta de calibrado.

4.8.3. Determinación de clorofila *a*

El contenido de clorofila *a* de cultivos de cianobacterias se determinó utilizando el procedimiento espectrofotométrico descrito por Marker en 1972 (76). Se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 12000 rpm (16620 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 mL de metanol y tras un minuto de agitación en vortex la suspensión se centrifugó a 12000 rpm (16620 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. La concentración de clorofila *a* en el sobrenadante se determinó midiendo la absorbancia a 665 nm en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS utilizando como referencia metanol y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar de la clorofila *a* es de $\epsilon_{665\text{nm}} = 74,46 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Todo el procedimiento se realizó en oscuridad, pues la clorofila *a* se degrada en presencia de luz.

4.8.4. Determinación de ficobiliproteínas

La concentración de ficobiliproteínas en cultivos de cianobacterias se calculó mediante el método descrito por Bryant et al. en 1976 (77), para lo cual se midió la absorbancia a 620 nm de los extractos de proteínas totales solubles en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS, utilizando como referencia una solución de Tris-HCl 50 mM pH 8. El coeficiente de extinción molar de las ficobiliproteínas es de $\epsilon_{620\text{nm}} = 7,41 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.8.5. Determinación de carotenoides

La concentración de carotenoides se determinó mediante el método descrito por Davies y Taylor en 1974 (78). Se centrifugaron 5 mL del cultivo en un tubo Falcon a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R, se descartaron 4 mL de sobrenadante y el pellet se resuspendió en el volumen restante, que se pasó a un tubo Eppendorf. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 4000 rpm (1087 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se descartó el sobrenadante.

El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se rompieron las células por sonicación con 5 ciclos de 45 s a amplitud del 80 % y ciclo 0,5 y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Finalmente la suspensión de células rotas se pasó a un tubo Falcon, se añadieron 4 mL de acetona y se centrifugaron a 3600 rpm (2500 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R.

Para obtener la concentración de carotenoides se midió la absorbancia del sobrenadante a 480 nm, 465 nm y 663 nm en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS, utilizando como referencia una solución de acetona, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Abs carotenoides} = \text{Abs}_{480 \text{ nm}} + 0.144 \cdot \text{Abs}_{662 \text{ nm}} - 0.638 \cdot \text{Abs}_{465 \text{ nm}}$$

$$\text{Concentración carotenoides (mg/mL)} = \frac{\text{Abs carotenoides}}{\epsilon \cdot l} \quad \text{donde } \epsilon = 250 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

4.8.6. Contaje celular

Para poder realizar el contaje celular las células se sometieron a un proceso de desagregación. Para ello se añadieron 250 μL de KOH 0,02 M sobre 250 μL de cultivo, de modo que la concentración final de KOH fue de 0,01 M, y la solución resultante se incubó durante 30 minutos a 80 °C. A continuación se añadieron 500 μL de medio de cultivo BG-11 y se empleó una cámara de Neubauer para realizar el contaje de las células. Se contó el número de células presentes en los filamentos de ambas estirpes de cianobacterias ubicados en los dos cuadrantes superiores y los dos inferiores y se calculó la densidad celular por mL teniendo en cuenta la dilución realizada y que el volumen de cada cuadrante es 10^{-4} mL.

4.9. Técnicas de microscopía

Se emplearon diversas técnicas de microscopía para estudiar las diferencias morfológicas y en la capacidad de diferenciación de heterocistos entre la estirpe silvestre y la estirpe EB2770FurC.

4.9.1. Microscopía de campo luminoso y de fluorescencia

La morfología de ambas estirpes de cianobacterias tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno se analizaron empleando un microscopio Nikon Eclipse 50i Epi-fluorescente. La autofluorescencia de las cianobacterias (fluorescencia de la clorofila *a*) se analizó empleando un filtro Texas Red (excitación con un filtro BP 560/40 y emisión con un filtro BP 630/60). Para observar las células se tomó 1 mL de cultivo, se centrifugó a 8000 rpm (5510 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se descartaron 800 µL de sobrenadante para concentrar el cultivo 5 veces. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon DXM 1200F acoplada al microscopio.

4.9.2. Tinción con “Alcian Blue”

Para visualizar heterocistos maduros y en desarrollo se empleó la tinción con “Alcian Blue” (33), que tiñe la envuelta de polisacáridos que rodea los heterocistos. Para ello se añadieron 5 µL de una solución de Alcian Blue 8GX al 0,5% (p/v) en etanol al 50 % (v/v) sobre 500 µL de cultivo y se incubaron durante 30 min a 30 °C. Antes de visualizar las células por microscopía óptica se eliminó el exceso de solución de colorante. Para ello se lavaron las células tres veces centrifugando a 8000 rpm (5510 x g) durante 1 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y resuspendiendo en 500 µL de medio BG-11.

4.9.3. Microscopía electrónica de transmisión

La ultraestructura de las células se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) empleando un microscopio TECNAI a 120V. Para ello se recogieron 2 mL de cultivo en un Eppendorf y se hicieron tres lavados centrifugando a 8000 rpm (5510 x g) durante 10 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y resuspendiendo suavemente el pellet con 2 mL de tampón Sörensen 0,2 M (Na₂HPO₄ 0,2 M, NaH₂PO₄ 0,2 M, pH 7,2). Tras el último lavado se añadió una solución de agar al 2 % (p/v) en tampón Sörensen 0,1 M (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,2) a 40 °C hasta cubrir el pellet. Una vez gelificado se sacó el agar del Eppendorf y se cortó en cubos de 1 mm de tamaño de arista, que se fijaron por inmersión en glutaraldehído al 3,125 % (v/v) en Tampón Sörensen 0,1 M (Na₂HPO₄ 0,1 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,2) durante 2 horas y se enviaron al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad Autónoma de Madrid para su posterior procesamiento y obtención de las imágenes.

5. Resultados y discusión

5.1. Papel de FurC en la regulación de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno

Estudios previos sugerían que el regulador transcripcional FurC (*alr0957*) podía desempeñar algún papel en la regulación del metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 (68,69). Habitualmente, para conocer la implicación de una proteína en un proceso celular se construyen mutantes de delección en los que esta proteína no se expresa. Sin embargo, dado que FurC parece ser una proteína esencial en *Anabaena* PCC7120, no fue posible obtener una cepa de delección este regulador transcripcional. Por ello, para conocer las implicaciones de FurC en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 se trabajó con una estirpe de sobreexpresión de FurC, EB2770FurC (63,72). En concreto, en este trabajo se llevó a cabo un análisis de los datos obtenidos en el perfil transcriptómico de la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno en comparación con la cepa *Anabaena* PCC7120, se estudiaron los cambios transcripcionales de genes referentes al metabolismo del nitrógeno y se analizó la regulación de estos genes por FurC.

5.1.1. Análisis del perfil transcriptómico de la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno

Se partió de un perfil transcriptómico en el que mediante RNA-seq (secuenciación del RNA) se comparaba la expresión de genes en la estirpe EB2770FurC con respecto a la estirpe silvestre tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno (Cristina Sarasa, datos no publicados).

El análisis del transcriptoma mostró que, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, en la estirpe de sobreexpresión de FurC se producían cambios en un total de 209 genes en comparación con la estirpe silvestre, de los cuales 146 presentaban un incremento en su expresión y 63 una disminución. Dentro de estos 209 genes no se incluyen aquellos genes anotados como proteínas hipotéticas que presentaban cambios en su transcripción y solo se consideraron cambios significativos en la expresión si el ratio (*fold change*) era superior a $\pm 1,5$ y el p-value $< 0,01$.

Cabe destacar que un 84% de los genes que cambiaban en condiciones de deficiencia de nitrógeno no sufrían cambios en un análisis transcriptómico comparativo realizado en presencia de nitrato, una fuente de nitrógeno combinado (Cristina Sarasa, datos no publicados), indicando una implicación del regulador transcripcional FurC en la respuesta de *Anabaena* PCC7120 a la deficiencia de nitrógeno.

La clasificación de los genes por categorías funcionales mostró que, dentro de los genes con expresión diferencial, había 15 genes implicados en fijación y metabolismo del nitrógeno y 10 implicados en diferenciación y maduración de heterocistos (Figura 4), lo que sugería que FurC podía actuar como regulador transcripcional de estos procesos. La mayor parte de estos genes estaban sobreexpresados y solo se producía una disminución de la transcripción para 4 de ellos, los cuales estaban implicados en fijación de nitrógeno y, en concreto, eran componentes del complejo de la nitrogenasa.

Además también se producían cambios relevantes en genes de procesos celulares que de forma indirecta están relacionados con la respuesta a la deficiencia de nitrógeno como son la síntesis de polisacáridos y glicoproteínas, que forman parte de la envuelta que rodea al heterocisto, o de genes implicados en transcripción y traducción, pues la diferenciación de heterocistos requiere un cambio en el perfil de expresión de muchos genes (35). También destacan los cambios observados en genes de fotosíntesis y respiración y que mayoritariamente consisten en una menor expresión de genes de proteínas del ficobilisoma. Los ficobilisomas se degradan en condiciones de deficiencia de nitrógeno para ser utilizados como fuente de este elemento y no están presentes en los heterocistos maduros (79). Esto se debe a que los ficobilisomas se ubican en las antenas del fotosistema II, el cual está ausente en los heterocistos.

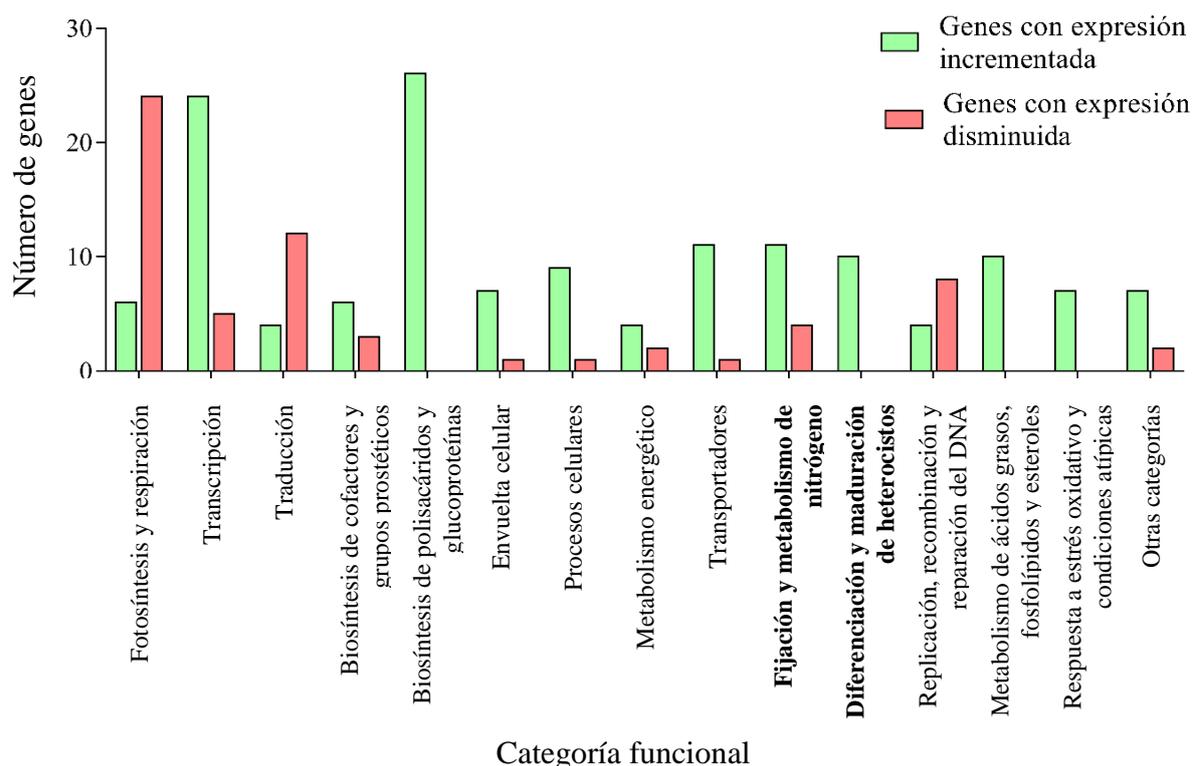


Figura 4. Distribución de los genes con funciones conocidas que mostraron expresión diferencial en el análisis transcriptómico comparativo de la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 . Las columnas verdes representan los genes cuya transcripción estaba incrementada más de 1,5 veces y las columnas rojas los genes cuya transcripción estaba disminuida más de 1,5 veces. La clasificación por categorías funcionales se hizo en base a los criterios establecidos en la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>).

No obstante, aunque se producían cambios en la expresión de genes de diferentes categorías funcionales, los estudios posteriores se limitaron al análisis de dos de ellas: (i) diferenciación y maduración de heterocistos y (ii) fijación y metabolismo de nitrógeno.

5.1.1.1. Genes implicados en diferenciación y maduración de heterocistos

A partir de los datos obtenidos en la transcriptómica se seleccionaron para su posterior análisis 9 genes implicados en el desarrollo de los heterocistos que constituían un total de 6 unidades transcripcionales: *hepC*, *alr4973-75*, *alr3646-48*, *hetZ*, *hglE* y *henR* (Tabla 3).

Gen	Nomenclatura	Descripción de la proteína	Cambio
<i>alr2834</i>	<i>hepC</i>	Proteína similar a glicosiltransferasa	1,72906
<i>alr4973</i>		Transportador ABC del heterocisto implicado en depositar polisacáridos y glicolípidos, homólogo de la proteína DevB	3,33693
<i>alr4974</i>		Transportador ABC del heterocisto implicado en depositar polisacáridos y glicolípidos, homólogo de la proteína DevC	2,94051
<i>alr0099</i>	<i>hetZ</i>	Factor de diferenciación del heterocisto	2,48282
<i>all1646</i>	<i>hglE</i>	Glicolípido sintasa del heterocisto	2,35443
<i>alr4975</i>		Transportador ABC del heterocisto implicado en depositar polisacáridos y glicolípidos, homólogo de la proteína DevA	2,21547
<i>alr3647</i>		Transportador ABC del heterocisto implicado en depositar polisacáridos y glicolípidos, homólogo de la proteína DevB	1,9778
<i>alr3649</i>		Transportador ABC del heterocisto implicado en depositar polisacáridos y glicolípidos, homólogo de la proteína DevA	1,52239
<i>alr1086</i>	<i>henR</i>	Regulador de respuesta	1,64916

Tabla 3. Cambios en la expresión de genes implicados en diferenciación y maduración de heterocistos obtenidos en el análisis del transcriptoma de la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre en condiciones de deficiencia de nitrógeno. La nomenclatura del gen y la descripción de la proteína se obtuvieron de la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>).

Los genes *hglE*, *hepC* y los operones *alr4973-75* y *alr3646-48* codifican para proteínas que participan en la formación de la envuelta que rodea al heterocisto: HglE es una glicolípido sintasa, HepC una glicosiltransferasa y los operones *alr4973-75* y *alr3646-48* codifican para transportadores ABC del heterocisto implicados en depositar los polisacáridos y glicolípidos que forman parte de la envuelta (35). Por su parte *hetZ* y *henR* codifican para reguladores transcripcionales. HetZ activa junto con HetR la expresión del gen *hetP*, lo cual es necesario para que se inicie el proceso de diferenciación a heterocisto (37) y que HenR es un regulador de respuesta que controla la síntesis de la envuelta de glicolípidos (35).

5.1.1.2. Genes implicados en fijación y metabolismo del nitrógeno

De igual manera se seleccionaron 10 genes implicados en fijación y metabolismo de nitrógeno para su posterior análisis: *nrtA*, *nrtB*, *nrtC*, *nrtD*, *nifJ*, *nifH2*, *all2026*, *all2027*, *xisH* y *xisI*, los cuales formaban parte de 6 unidades transcripcionales: *nirA-nrtABCD-narB*, *nifJ*, *nifH2*, *all2026*, *all2027* y *xisHI* (Tabla 4).

Gen	Nomenclatura	Descripción de la proteína	Cambio
<i>alr0610</i>	<i>nrtC</i>	Transportador de nitrato de tipo ABC	2,20001
<i>alr0611</i>	<i>nrtD</i>	Transportador de nitrato de tipo ABC	1,90432
<i>alr0608</i>	<i>nrtA</i>	Transportador de nitrato	1,84355
<i>alr0609</i>	<i>nrtB</i>	Permeasa transportadora de nitrato	1,78647
<i>alr2803</i>	<i>nifJ</i>	Piruvato flavodoxina oxidorreductasa	-1,87773
<i>alr0874</i>	<i>nifH2</i>	Nitrogenasa reductasa	-2,89701
<i>all2026</i>		Proteína similar a nitrilo hidratasa	3,68331
<i>all2027</i>		Proteína similar a nitrilo hidratasa	2,76287
<i>alr1461</i>	<i>xisH</i>	Factor controlador de la escisión del elemento <i>fdxN</i>	1,60086
<i>alr1462</i>	<i>xisI</i>	Factor controlador de la escisión del elemento <i>fdxN</i>	1,60086

Tabla 4. Cambios en la expresión de genes implicados en fijación y metabolismo de nitrógeno obtenidos en el análisis del transcriptoma de la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre en condiciones de deficiencia de nitrógeno. La nomenclatura del gen y la descripción de la proteína se obtuvieron de la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>).

Los genes *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD* codifican para subunidades de un transportador de nitrato de tipo ABC (ATP-binding cassette) y forman parte de un operón junto con los genes *nirA*, que codifica para la nitrito reductasa y *narB*, que codifica para la nitrato reductasa (23). Los genes *all2026* y *all2027* también están implicados en la asimilación de nitrógeno, pues codifican para dos isoenzimas de nitrilo hidratatas, enzimas que catalizan la hidratación de nitrilos a amidas, las cuales posteriormente son hidrolizadas a amonio por la amidasa (80).

Por su parte los genes *nifJ* y *nifH2* están implicados en la fijación de nitrógeno. El gen *nifJ* codifica para la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa, que cataliza la reducción de la ferredoxina proporcionando poder reductor que permite la fijación de nitrógeno, y el gen *nifH2* codifica para el componente dinitrogenasa reductasa de una nitrogenasa alternativa que no se expresa en el heterocisto y se piensa que es un vestigio evolutivo (28). Finalmente el operón *xisHI* codifica para dos proteínas que controlan a la recombinasa XisF, enzima responsable de llevar a cabo la excisión de un fragmento de DNA que interrumpe el gen de la ferredoxina del heterocisto (*fdxN*). Esta excisión es necesaria para que la ferredoxina del heterocisto pueda expresarse y por tanto para que pueda tener lugar la fijación de nitrógeno, pues esta proteína es la responsable de proporcionar electrones a la nitrogenasa (14).

5.1.2. Análisis por Real Time RT-PCR de cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno

El análisis del transcriptoma sugería que FurC podía regular el metabolismo del nitrógeno en *Anabaena* PCC7120, pues se producían cambios en la expresión de genes implicados en fijación y metabolismo de nitrógeno y en diferenciación de heterocistos. Para estudiar más en detalle los cambios transcripcionales de estos genes y validar los cambios observados en estas categorías funcionales se utilizó la Real Time RT-PCR, que generalmente proporciona datos más precisos de la inducción y la represión de los genes. Los genes *all2026* y *all2027* no pudieron ser analizados por Real Time RT-PCR, pues su mRNA tiene un tamaño muy corto, pero se tuvieron en cuenta para posteriores estudios, pues entre los genes implicados en metabolismo y fijación de nitrógeno, eran los que presentaban un mayor cambio en el análisis por RNA-seq.

Además de los genes anteriores también se analizaron cambios en la expresión de 5 genes cruciales para el proceso de diferenciación de heterocistos: *ntcA*, *hetR*, *hepA*, *hepK* y *hetC* que, aunque no mostraron expresión diferencial en el análisis por RNA-seq, era posible que presentaran expresión diferencial al ser analizados por Real Time RT-PCR. Esto se debe a que los datos proporcionados por el RNA-seq, al ser un método de screening, muchas veces no contemplan los cambios transcripcionales de todos los genes del genoma de un organismo. NtcA y HetR son dos reguladores transcripcionales imprescindibles para que se produzca la diferenciación de heterocistos, HepA es un transportador de tipo ABC implicado en la síntesis de la envuelta de polisacáridos, HepK es una histidin quinasa perteneciente a un sistema de dos componentes que regula la formación de la envuelta del heterocisto y HetC es un transportador de tipo ABC que transporta factores que controlan la formación del heterocisto (35).

Tras realizar las Real Time RT-PCR de los genes de estudio se obtuvieron los resultados que aparecen en la figura 5, en la que se representa cómo cambia su expresión en la estirpe EB2770FurC en comparación con la estirpe silvestre tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno. Solo se consideraron cambios significativos en la expresión si el ratio (*fold change*) era superior a $\pm 1,5$.

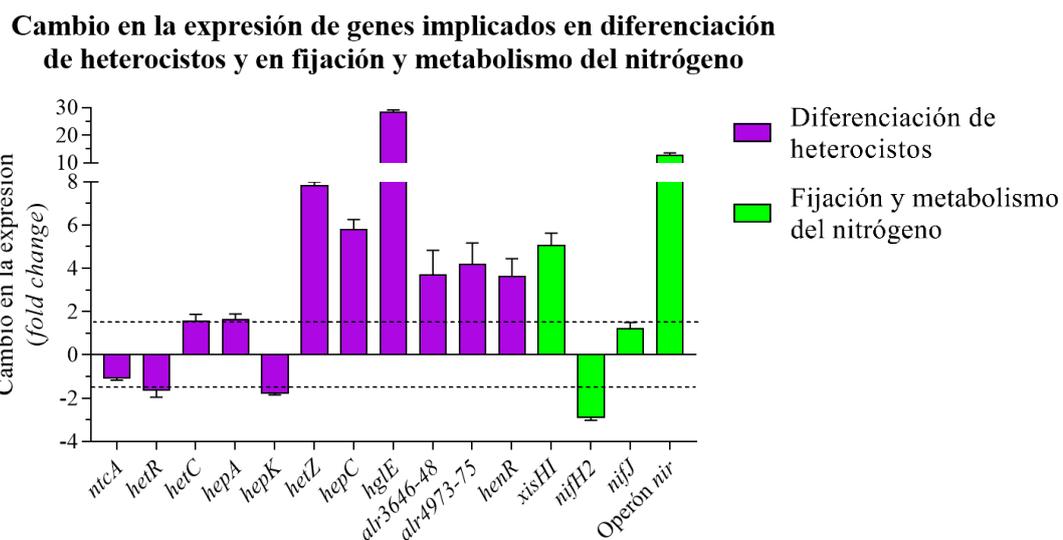


Figura 5. Cambio en los niveles de expresión de genes implicados en diferenciación de heterocistos (violeta) y fijación y metabolismo del nitrógeno (verde) en la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 medidos mediante Real Time RT-PCR. **Nota:** Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas y solo se consideraron cambios significativos si el cambio en la expresión era superior a $\pm 1,5$.

Como se observa en la figura 5 se potenciaban los cambios observados en el análisis por RNA seq, validando así el análisis transcriptómico. La única excepción fue el gen *nifJ*, en el que aunque el análisis por RNA-seq indicaba que su expresión disminuía 1,8 veces, el análisis por Real Time RT-PCR reflejó que su expresión no cambiaba significativamente. Además también se observó que los genes *hetR*, *hepA*, *hepK* y *hetC*, que no presentaban expresión diferencial en el análisis transcriptómico, si mostraban cambios en su expresión al ser analizados por Real Time RT-PCR. En concreto para *hetR* y *hepK* su expresión estaba reducida -1,61 y -1,75 veces y para *hepA* y *hetC* estaba incrementada 1,63 y 1,56 veces.

De este modo se determinó que en la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno, mayoritariamente se producía una sobreexpresión de genes implicados en metabolismo y fijación de nitrógeno y en diferenciación de heterocistos destacando los genes *hetZ*, *hglE* y el operon *nir* (*nirA-nrtABCD-narB*), que estaban inducidos 7,8, 28,4 y 12,6 veces, respectivamente.

5.1.3. Estudio de la unión de FurC a promotores de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno

Los resultados anteriores mostraban que la sobreexpresión del regulador transcripcional FurC afectaba a la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y la formación de heterocistos, lo que podía deberse a que fueran dianas directas de este regulador transcripcional, es decir, que FurC se uniera a su región promotora y controlara su transcripción, o a que su expresión cambiara de forma indirecta. Por tanto para conocer si los genes cuya expresión cambiaba al ser medidos por Real Time RT-PCR eran dianas directas de FurC se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel.

Para realizar estos ensayos se llevó a cabo una purificación de la proteína FurC mediante sobreexpresión heteróloga en *E.coli*, cuyos resultados se recogen en la sección 8.7 de Material Suplementario. Se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 con el plásmido pET-28a/*furC* y se realizó un ensayo de sobreexpresión (Figura S-1 de Material Suplementario). Se seleccionó la colonia con mayor sobreexpresión y se llevó a cabo la producción de biomasa y la purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa. Tras finalizar la purificación se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna de purificación para determinar en cuales se encontraba la proteína de interés (Figura S-2 de Material Suplementario) y tras la diálisis y cuantificación de las fracciones seleccionadas se efectuó un ensayo de retardo en gel con la región promotora de *prxA* para comprobar que la proteína estaba activa (Figura S-3 de Material Suplementario).

Se analizó si FurC era capaz de unirse a los promotores de los genes de interés empleando fragmentos de DNA de 300-400 pb localizados upstream del punto de inicio de la transcripción que correspondían a sus regiones promotoras de los genes. En el caso de promotores de gran tamaño, como los de los genes *hetR*, *hepA*, *hepC* y *hetC* la región promotora se analizó mediante varios fragmentos de 300-400 pb. Los ensayos se llevaron a cabo en las condiciones en las que el regulador transcripcional es activo, es decir, 1 mM de DTT y 0,1 mM de $MnCl_2$ y se emplearon dos concentraciones de proteína, 400 y 800 nM, pues estudios previos mostraron que para estos valores de concentración FurC era capaz de unirse de forma específica a sus promotores diana (63). Además para comprobar que las condiciones empleadas eran óptimas se llevaron a cabo controles positivos y negativos, cuyos resultados se muestran en la figura 6.

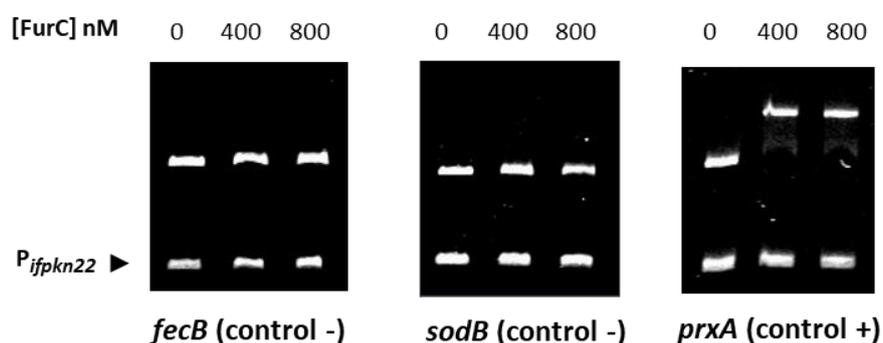


Figura 6. Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de los genes *fecB* y *sodB* (controles negativos) y el gen *prxA* (control positivo). El carril 1 corresponde al promotor libre y los carriles 2 y 3 corresponden al promotor incubado con 400 y 800 nM de FurC, respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

Como control positivo se usó la región promotora del gen *prxA*, pues en estudios previos se describió que era diana directa de FurC (62), y como control negativo se usaron los genes *fecB* y *sodB*. El gen *fecB* codifica para un transportador periplásmico de tipo ABC implicado en la captación de hierro cuya expresión está 16 veces incrementada en la estirpe de sobreexpresión de FurC pero que en estudios previos demostró ser una diana indirecta (Cristina Sarasa, datos no publicados). Por su parte, *sodB* codifica para una superóxido dismutasa dependiente de hierro cuya expresión no cambia estirpe de sobreexpresión de FurC y que también demostró no ser diana de FurC (Cristina Sarasa, datos no publicados). Como se puede observar en la figura 6 en las condiciones estudiadas no se observó retardo en los promotores de los controles negativos mientras que si se producía una migración retardada en el promotor del control positivo, lo que indicaba que las condiciones seleccionadas eran óptimas.

Una vez que se había determinado que las condiciones eran adecuadas se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con las regiones promotoras de genes implicados en diferenciación y maduración de heterocistos (Figura 7) y de genes implicados en fijación y metabolismo de nitrógeno (Figura 8).

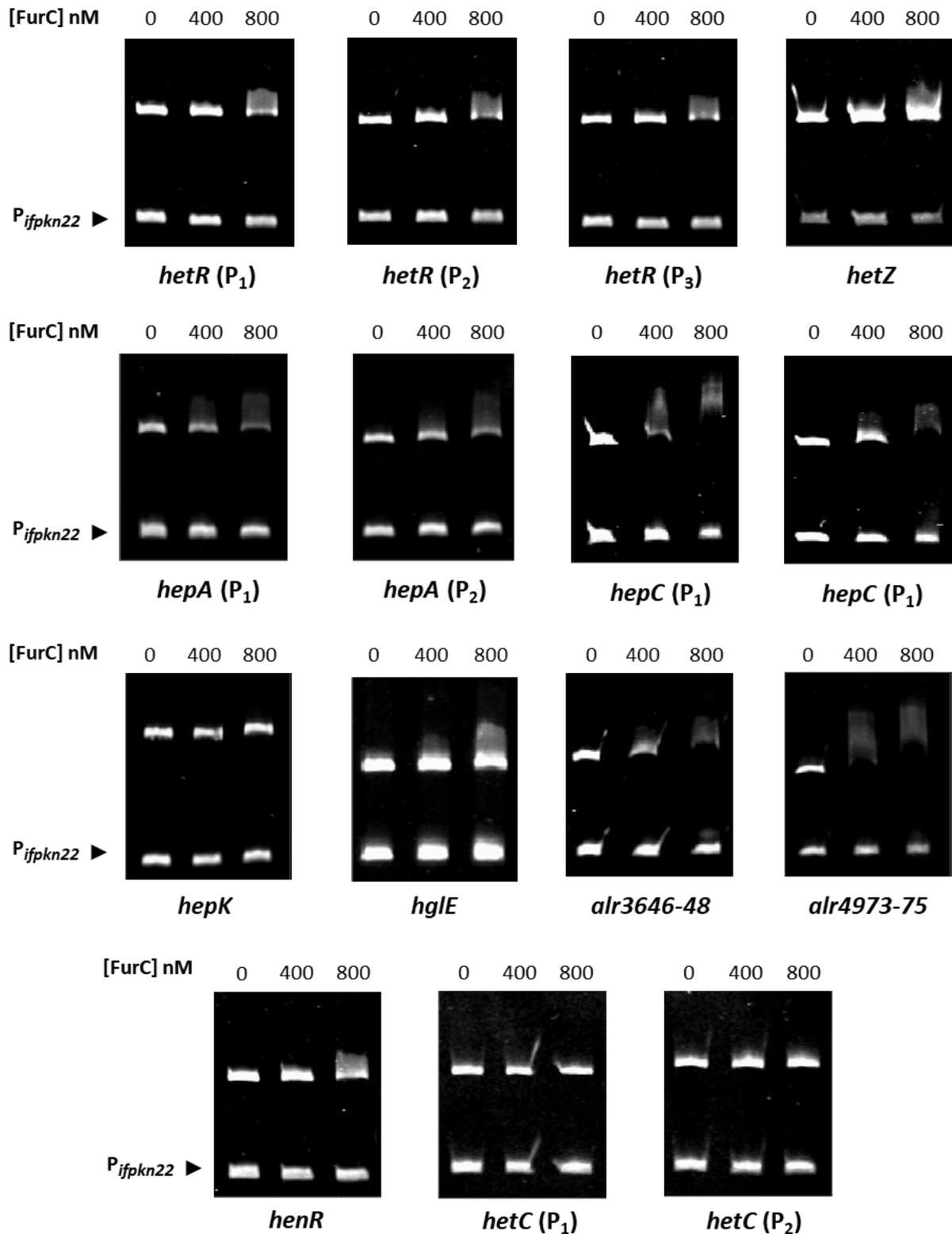


Figura 7. Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de genes implicados en la formación de heterocistos. El carril 1 corresponde al control negativo (sin proteína) y los carriles 2 y 3 corresponden al promotor incubado con 400 y 800 nM de FurC, respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

Como se puede observar en la figura 7 FurC era capaz de unirse *in vitro* a la región promotora de casi todos los genes implicados en la diferenciación de heterocistos que mostraron expresión diferencial en el análisis por Real Time RT-PCR. Se puede observar que para los genes *hetR*, *hetZ*, *hepA*, *hepC*, *hglE*, *alr3646-48*, *alr4973-75* y *henR* los fragmentos de DNA correspondientes a sus regiones promotoras mostraban una migración retardada a una concentración de 800 nM. Además para ese mismo valor de concentración no se producía retardo para el DNA competidor, lo que indicaba que la unión era específica. La excepción fueron los genes *hetC* y *hepK*, en los que, aunque su expresión cambiaba al ser analizados por Real Time RT-PCR, FurC no era capaz de unirse *in vitro* a sus regiones promotoras, lo que sugiere que se trataría de genes regulados de forma indirecta. Además, cabe destacar que en el caso de genes con regiones promotoras de gran tamaño como *hetR*, *hepA* y *hepC* FurC era capaz de unirse a todos los fragmentos de la región promotora, lo que sugiere la existencia de varios sitios de unión de FurC en los promotores de estos genes.

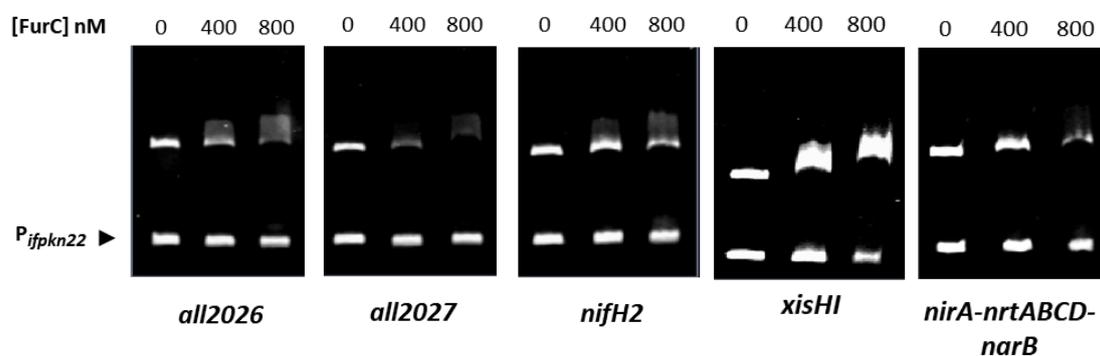


Figura 8. Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de genes implicados en metabolismo y fijación de nitrógeno. El carril 1 corresponde al promotor libre y los carriles 2 y 3 corresponden al promotor incubado con 400 y 800 nM de FurC, respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

En el caso de los genes implicados en metabolismo y fijación de nitrógeno se observó que, como se muestra en la figura 8, FurC se unía *in vitro* a las regiones promotoras de todos los genes seleccionados anteriormente, incluyendo las nitrilo hidratasa, que aunque no pudieron ser analizadas por Real Time RT-PCR mostraban un cambio considerable en su expresión en el análisis por RNA-seq. Por tanto estos resultados sugieren que FurC regula de forma directa genes implicados en metabolismo y fijación de nitrógeno y en la diferenciación de heterocistos, lo que supone una función novedosa para este regulador transcripcional.

5.2. Aspectos morfológicos y respuestas fisiológicas de la estirpe EB2770FurC a la deficiencia de nitrógeno

Tras determinar que FurC regulaba de forma directa algunos genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y la diferenciación de heterocistos, se estudiaron diversos aspectos morfológicos y fisiológicos de la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno.

5.2.1. Aspectos morfológicos

Se analizó la morfología de ambas estirpes tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno empleando diversas técnicas de microscopía: tinción con “Alcian Blue”, microscopía de campo luminoso, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión. Estudios previos pusieron de manifiesto que este tiempo era suficiente para apreciar la formación de heterocistos en filamentos de *Anabaena* PCC7120 (14).

5.2.1.1. Tinción con “Alcian Blue”

El “Alcian Blue” es un colorante básico que tiñe de color azul polisacáridos ácidos como los polisacáridos que se encuentran en la envuelta del heterocisto. Por tanto permite poner de manifiesto la presencia de heterocistos en filamentos de cianobacterias, que aparecen como células de un tamaño ligeramente mayor que las células vegetativas y rodeadas de un halo de color azul, pues los polisacáridos forman una envuelta alrededor del heterocisto (14). Por ello, para estudiar la formación de heterocistos en la estirpe silvestre y en la estirpe de sobreexpresión de FurC se llevó a cabo una tinción de los filamentos con Alcian Blue, que se observaron mediante microscopía de campo luminoso (Figura 9)

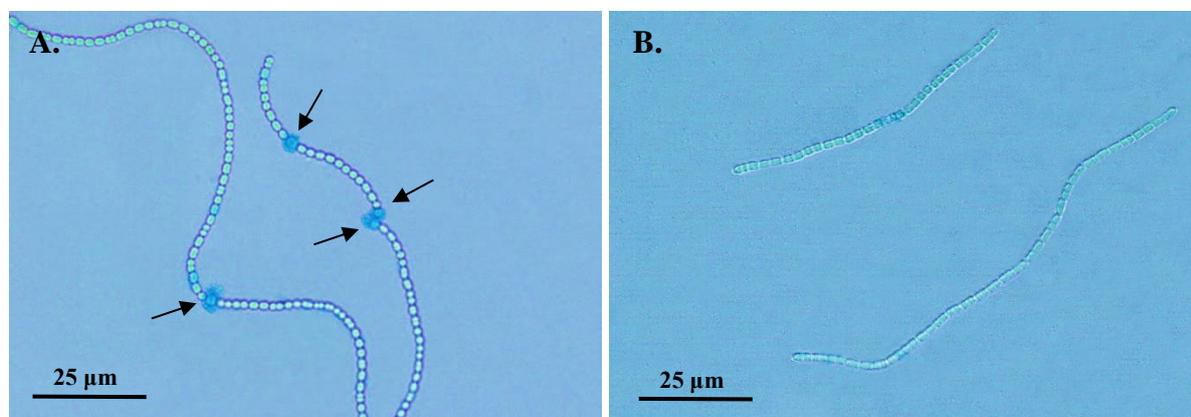


Figura 9. Imágenes de microscopía de campo luminoso de filamentos de la estirpe silvestre *Anabaena* PCC7120 (A) o de la estirpe de sobreexpresión de FurC EB2770FurC (B) teñidos con “Alcian Blue” tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 (40 aumentos). Los heterocistos aparecen señalados con flechas de color negro

Como se puede observar en la figura 9A tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno la estirpe silvestre es capaz de formar heterocistos, que aparecen teñidos de color azul. Sin embargo no se observan células teñidas de color azul en la estirpe de sobreexpresión de FurC (Figura 9B), lo que indica o bien que esta estirpe no es capaz de formar heterocistos o que sus heterocistos carecen de la envuelta de polisacáridos

5.2.1.2. Observación mediante microscopía de campo luminoso y de fluorescencia

Para determinar si efectivamente la estirpe EB2770FurC no era capaz de formar heterocistos se visualizaron filamentos de la estirpe silvestre y de la estirpe EB2770FurC tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno mediante microscopía óptica y de fluorescencia (Figura 10)

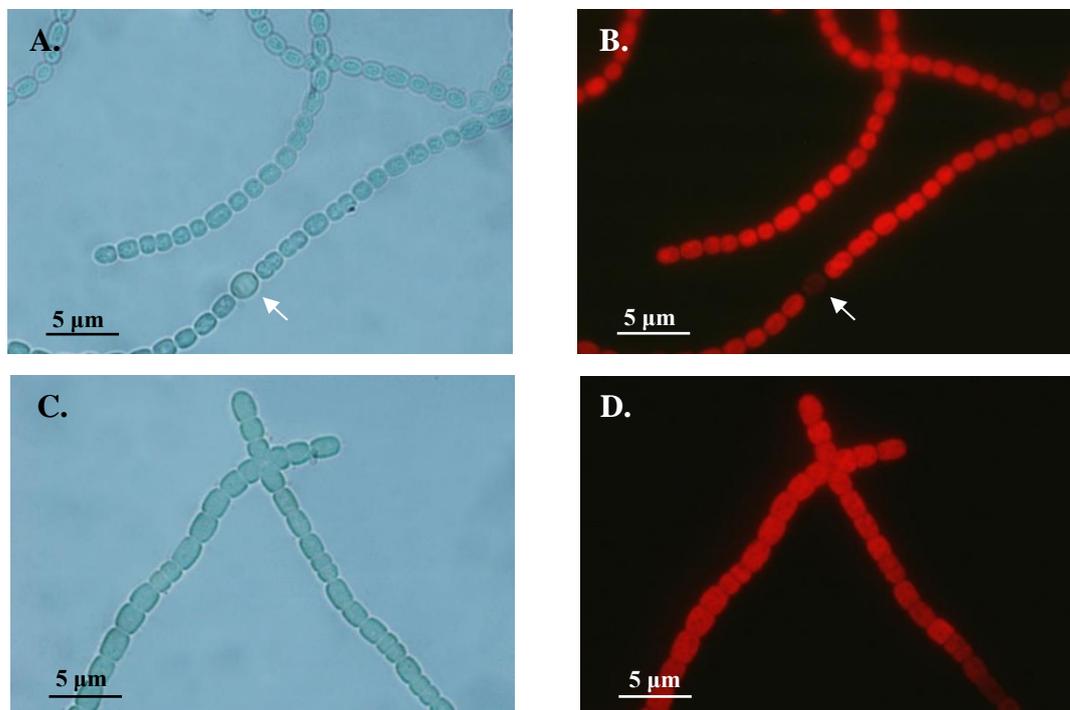


Figura 10. Filamentos de la estirpe silvestre *Anabaena* PCC7120 tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 tomadas mediante microscopía de campo luminoso (A) o microscopía de fluorescencia (B). Filamentos de la estirpe de sobreexpresión de FurC EB2770FurC tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 tomadas mediante microscopía de campo luminoso (C) o microscopía de fluorescencia (D). Los heterocistos aparecen señalados con flechas de color blanco

Al igual que se podía observar en el apartado anterior, tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno la estirpe silvestre es capaz de formar heterocistos (Figura 10A). Se puede observar que son células de un tamaño ligeramente superior al de las células vegetativas y de forma redondeada, con una pigmentación más débil como consecuencia de la pérdida de pigmentos fotosintéticos, y se pueden apreciar los granulos polares de cianoficina en los puntos de unión con las células vegetativas. En los heterocistos no hay fotosistema II para evitar la producción de oxígeno que inhibiría a la enzima nitrogenasa, disminuyendo drásticamente la cantidad de clorofila *a*, que emite fluorescencia de color rojo. Por ello, como se puede observar en la figura 10B., cuando los filamentos de *Anabaena* se observan mediante microscopía de fluorescencia es posible identificar los heterocistos, ya que a diferencia de las células vegetativas no emiten fluorescencia intensa.

Por el contrario, como se muestra en la figura 10C, al observar la estirpe EB2770FurC en deficiencia de nitrógeno mediante microscopía óptica no se observaron células que presentaran la morfología típica del heterocisto. Además, al visualizar los filamentos mediante microscopía de fluorescencia (Figura 10D), tampoco se observaron células que perdieran la emisión de fluorescencia. Por tanto en base a estos resultados se concluyó que tras 48 horas de deficiencia de nitrógeno combinado la estirpe EB2770FurC no era capaz de formar heterocistos, a diferencia de la estirpe silvestre.

Además se realizaron estudios a tiempos más largos en los que tampoco se apreció la formación de heterocistos (datos no mostrados), lo que permitió concluir que la estirpe EB2770FurC no era capaz de formar heterocistos.

5.2.1.3. Observación mediante TEM

Con las técnicas de microscopía anteriores se había observado que la estirpe EB2770FurC no era capaz de formar heterocistos. No obstante era posible que existieran proheterocistos o células que, aunque no tuvieran el aspecto de los heterocistos maduros, tuvieran una estructura interna ligeramente diferente a la de las células vegetativas. Esto sugeriría que la estirpe EB2770FurC sería capaz de iniciar el proceso de diferenciación de heterocistos pero que este queda bloqueado en algún punto. Por ello se tomaron imágenes de los filamentos de la estirpe silvestre y de la estirpe EB2770FurC mediante TEM, una técnica de microscopía que permite observar la estructura interna de las células (Figura 11).

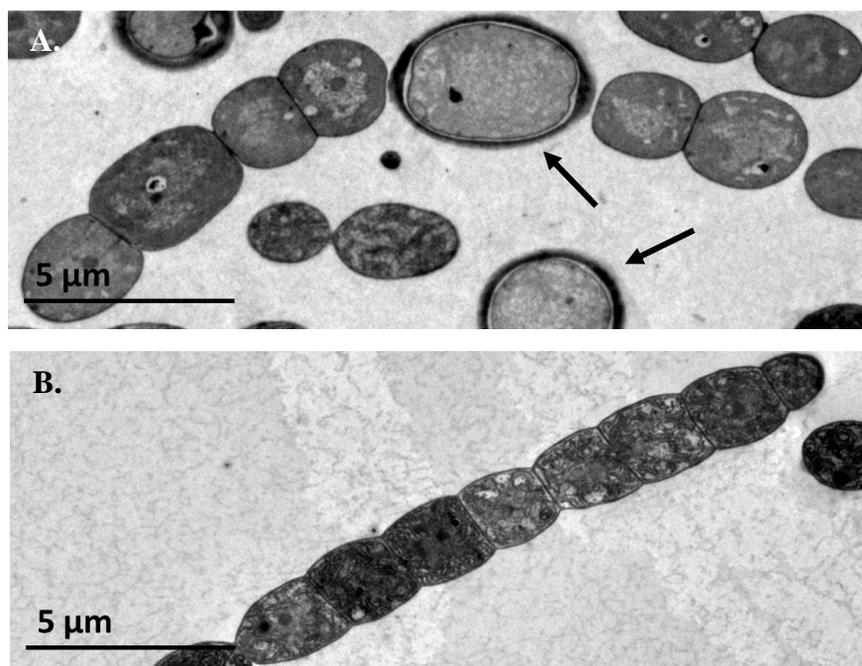


Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de filamentos de la estirpe silvestre *Anabaena* PCC7120 (A) o de la estirpe de sobreexpresión de FurC EB2770FurC (B) tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de NaNO_3 . Los heterocistos aparecen señalados con flechas de color negro.

Como se puede observar en la figura 11A, en la estirpe silvestre los heterocistos presentan una estructura interna considerablemente diferente a la de las células vegetativas, debida principalmente a la ausencia de la maquinaria fotosintética del PSII. Sin embargo en la estirpe EB2770FurC todas las células tienen una estructura interna similar (Figura 11B), lo que sugiere que la sobreexpresión del regulador transcripcional FurC impide la formación de heterocistos desde etapas tempranas.

No obstante sí que se observan diferencias significativas en la morfología de las células vegetativas de ambas estirpes, pues en la estirpe silvestre los septos que comunican las células del filamento son finos mientras que en la estirpe EB2770FurC las regiones de contacto entre células vecinas abarcan prácticamente la totalidad de la célula.

5.2.2. Niveles de proteína total soluble y pigmentos fotosintéticos

Aunque los heterocistos maduros se forman tras 48 horas en deficiencia de nitrógeno los cambios fisiológicos no se producen hasta que han transcurrido 72 horas (14). Por ello se analizaron los niveles de proteína total soluble y pigmentos fotosintéticos de la estirpe silvestre y de la estirpe de sobreexpresión de FurC tras 72 horas en medio BG-11 carente de NaNO_3 para determinar cómo la deficiencia de nitrógeno afectaba a su fisiología. Los resultados de estas determinaciones se recogen en la figura 12.

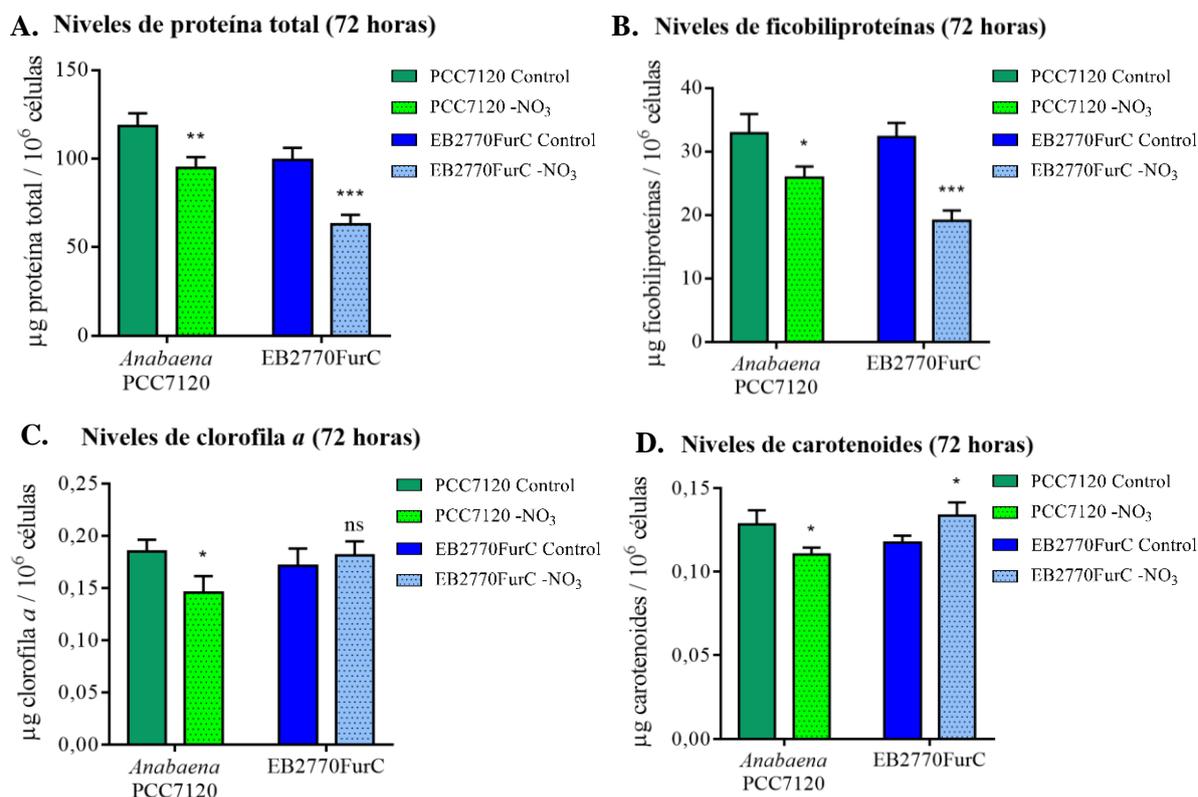


Figura 12. Contenido en proteína total soluble ($\mu\text{g}/10^6$ células) (A), ficobiliproteínas ($\mu\text{g}/10^6$ células) (B), clorofila *a* ($\mu\text{g}/10^6$ células) (C) y carotenoides ($\mu\text{g}/10^6$ células) (D) en la estirpe silvestre y en la estirpe EB2770FurC tras 72 horas en deficiencia de nitrógeno. **Nota.** Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas: ns no significativo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, calculados mediante un análisis estadístico tipo t-test comparando cada dato con respecto a su control

Como se refleja en la figura 12A en deficiencia de nitrógeno se produce una disminución significativa en el contenido en proteína total soluble en ambas estirpes, siendo ligeramente mayor en la estirpe EB2770FurC. En el caso de la estirpe silvestre esto podría deberse a que como consecuencia de la formación de heterocistos, las cianobacterias sufren un estrés general hasta que se adaptan a las nuevas condiciones. Por su parte en el caso de la estirpe EB2770FurC, la disminución en el contenido de proteína total podría estar ocasionado porque, debido a la ausencia de heterocistos, la fijación de nitrógeno está impedida y disminuye la síntesis de nuevas proteínas.

Puesto que la fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más importantes de las cianobacterias también se determinaron los niveles de pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenoides. Las ficobiliproteínas forman parte de la maquinaria fotosintética y en una situación de deficiencia de nitrógeno son degradadas para ser utilizadas como fuente de nitrógeno (79), lo que explicaría la disminución observada en ambas estirpes en un medio carente

de nitrógeno combinado (Figura 12B). No obstante el descenso es mucho más acusado en el caso de la estirpe de sobreexpresión de FurC, lo que podría deberse a que al no ser capaz de formar heterocistos, la degradación de ficobiliproteínas es la única fuente de nitrógeno de la que disponen. Además puesto que las ficobiliproteínas constituyen cerca del 50% del contenido en proteína total, su descenso podría contribuir a la disminución en el contenido en proteína total que se observa en la figura 12A.

La clorofila *a* es responsable de la captación de luz en las antenas del fotosistema y es un excelente indicador de estrés general, ya que la afectación de la maquinaria fotosintética es una de las primeras respuestas a estreses (81). Como se puede observar en la figura 12C en un medio carente de nitrógeno combinado se produjo una disminución significativa del contenido en clorofila *a* en la estirpe silvestre, lo que indica un detrimento general de la fisiología celular como consecuencia de la fijación de nitrógeno. Además esta disminución también podría deberse a que en los heterocistos no se expresa el fotosistema II para evitar la liberación de oxígeno durante la fotosíntesis, que inactivaría a la nitrogenasa. En el caso de la estirpe EB2770FurC la clorofila *a* se mantiene en niveles parecidos, lo que tal vez podría deberse a que como consecuencia de la disminución en los niveles de ficobiliproteínas la clorofila *a* asume un mayor papel en las antenas del fotosistema II para mantener la fotosíntesis.

Los carotenoides están presentes en las antenas de los fotosistemas y juegan un importante papel en mecanismos de defensa oxidativa (81). Como refleja la figura 12D. en la estirpe silvestre en deficiencia de nitrógeno se produce una disminución en los niveles de carotenoides, lo que podría deberse a que los heterocistos no tienen fotosistema II, una de las mayores fuentes de radicales libres. Por el contrario, en el caso de la estirpe EB2770FurC el contenido en carotenoides se ve incrementado, lo que podría deberse a un aumento del estrés oxidativo al no ser capaz de diferenciar heterocistos o a las alteraciones que presenta en su aparato fotosintético (63).

5.3. Las proteínas Fur como potenciales sensores del balance carbono/nitrógeno a través de la unión con 2-oxoglutarato (2-OG)

Como se ha comentado en la introducción, estudios previos habían determinado que NtcA, el regulador global del metabolismo del nitrógeno, era capaz de sensar el balance carbono/nitrógeno a través de la unión con 2-OG, modulando su actividad de unión al DNA en respuesta a los niveles de este metabolito (46). Puesto que previamente se había descrito que el regulador transcripcional FurA contribuía a la regulación de la formación de heterocistos (66) y en este trabajo se ha puesto de manifiesto que FurC regula de forma directa genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y la diferenciación de heterocistos, se decidió estudiar si estos dos reguladores transcripcionales también podían actuar como sensores del balance carbono/nitrógeno.

Para poder realizar estos ensayos se llevó a cabo una purificación de la proteína FurA mediante sobreexpresión heteróloga en *E.coli*, cuyos resultados se recogen en la sección 8.8 de Material Suplementario. Se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 con el plásmido pET-28a/*furA* y se llevó a cabo un ensayo de sobreexpresión (Figura S-4 de Material Suplementario) para determinar que colonia sobreexpresaba más. Se seleccionó la colonia con mayor sobreexpresión y se llevó a cabo la producción de biomasa y la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a un ión metálico (IMAC). Tras finalizar la

purificación se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna para determinar en cuales se encontraba la proteína de interés (Figura S-5 de Material Suplementario). Finalmente, tras la diálisis y cuantificación de las fracciones seleccionadas, se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel con la región promotora de *ntcA* para comprobar que la proteína estaba activa (Figura S-6 de Material Suplementario).

5.3.1. Estudio de la interacción del 2-OG con FurA y FurC mediante calorimetría de titulación isotérmica

Se llevaron a cabo ensayos de calorimetría de titulación isotérmica para determinar si FurA y FurC eran capaces de unirse *in vitro* al 2-OG. Para que estos reguladores transcripcionales sean activos y capaces de unirse al DNA se requiere la presencia de DTT, que proporciona un ambiente reductor en el que los puentes disulfuro están reducidos, y $MnCl_2$ como metal correpresor (el Mn^{2+} se usa en sustitución del Fe^{2+} debido a la rápida oxidación de este metal a Fe^{3+}) (54,62). Por ello los ensayos se realizaron en ausencia de metal correpresor y condiciones reductoras, en presencia de metal correpresor (0,1 mM de $MnCl_2$), en presencia de condiciones reductoras (1 mM de DTT) y en presencia de ambas condiciones (0,1 mM de $MnCl_2$ y 1 mM de DTT).

5.3.1.1. Estudio de la interacción de FurA con 2-OG

La interacción del 2-OG con FurA se analizó mediante calorimetría de titulación isotérmica. Los datos obtenidos se analizaron mediante regresión no lineal, proporcionando los resultados que se muestran en la figura 13.

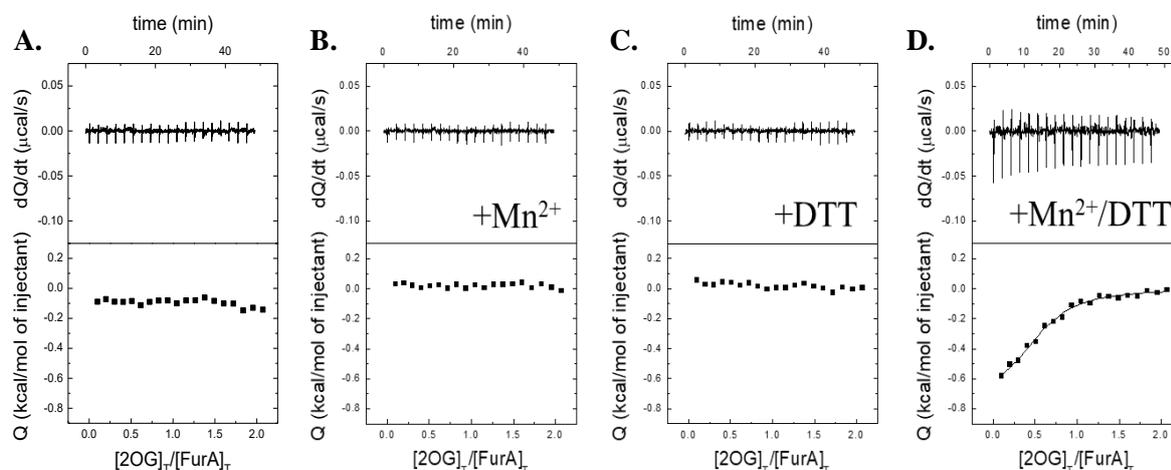


Figura 13. Estudio de la interacción del 2-OG con FurA en ausencia de metal correpresor (Mn^{2+}) y condiciones reductoras (A), en presencia de metal correpresor (B), en presencia de condiciones reductoras (C) y en presencia de ambas condiciones (D). Se muestran las representaciones de dQ/dt vs tiempo y Q vs ratio molar ligando/proteína de los datos obtenidos en la calorimetría. Los ensayos se realizaron a 25 °C en tampón acético acetato pH=4 y se hicieron por duplicado, obteniéndose el mismo resultado.

Como se refleja en la figura 13, el análisis de los datos experimentales mostró que FurA era capaz de interactuar con 2-OG, pero que la unión requería de las condiciones en las que el regulador transcripcional es activo, es decir, presencia de metal correpresor y condiciones reductoras (Figura 13D.). En ausencia de estas condiciones no se detectaba cambio en la entalpía a lo largo de la titulación (Figura 13A, 13B y 13C), lo que era indicativo de que no se producía interacción entre FurA y el 2-OG.

Para caracterizar la interacción observada entre FurA y el 2-OG se llevó a cabo una determinación de los parámetros termodinámicos (Tabla 5).

	K (M^{-1}) ^a	K_d (μM) ^a	ΔH (kcal/mol) ^b	n
FurA +Mn ²⁺ +DTT	$3,6 \cdot 10^5$	2,8	-0,7	0,55

Tabla 5. Parámetros termodinámicos para la interacción de FurA con 2-OG en presencia de condiciones reductoras y metal correpresor. K corresponde a la constante de equilibrio, K_d a la constante de disociación, ΔH a la variación de entalpía y n a la estequiometría. Los datos se obtuvieron a 25 °C en tampón acético acetato pH=4. ^aEl error relativo en los valores de K y K_d es del 15 %. ^bEl error absoluto en el valor de ΔH es de 0,4 kcal/mol.

Los parámetros termodinámicos mostraron que, en presencia de metal correpresor y condiciones reductoras, la afinidad de la interacción se encontraba en el rango de concentración micromolar, con una constante de disociación de $K_d=2,8 \mu M$. La estequiometría observada fue de $n=0,55$, sugiriendo que posiblemente una molécula de 2-OG se une a un dímero de proteína. Sin embargo, no puede descartarse que en la preparación utilizada solo el 55 % de moléculas de proteína fueran activas y capaces de unirse al metabolito, lo que podría deberse, entre otras causas, a la agregación parcial de la proteína. Además trabajos previos mostraron que los distintos puentes disulfuro que podían establecerse entre los cinco residuos de cisteína de FurA estaban íntimamente relacionados con su capacidad de unirse al DNA (58). Por otra parte el hecho de que en ausencia de metal correpresor y/o de condiciones reductoras el 2-OG no fuera capaz de unirse a FurA ponía de manifiesto que la interacción del 2-OG con las proteínas Fur no era un fenómeno inespecífico.

5.3.1.2. Estudio de la interacción de FurC con 2-OG

La capacidad de FurC de interaccionar con el 2-OG también se estudió mediante calorimetría de titulación isotérmica y se llevó a cabo un análisis de los datos obtenidos mediante regresión no lineal, que proporcionó los resultados que se muestran en la figura 14.

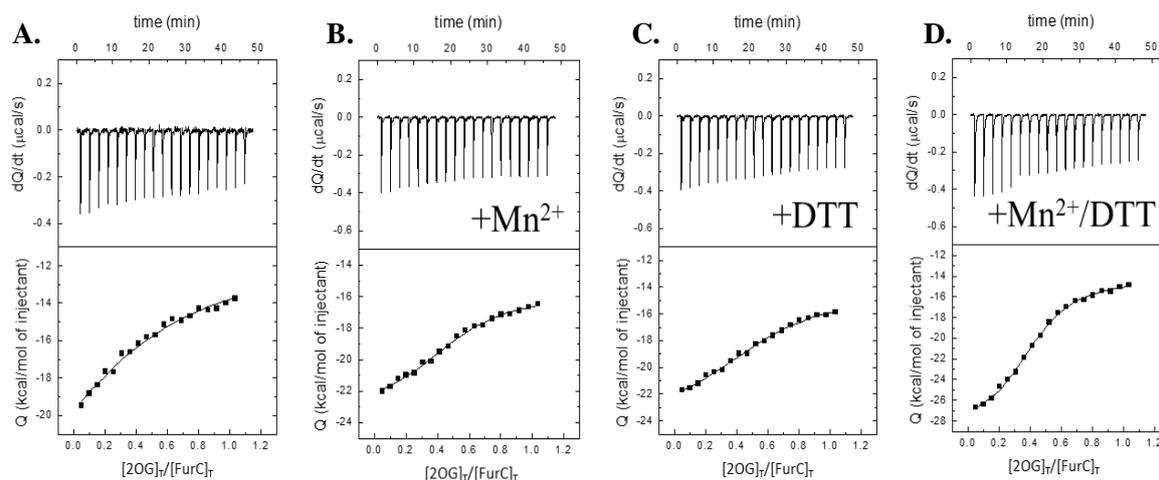


Figura 14. Estudio de la interacción del 2-OG con FurC en ausencia de metal correpresor (Mn^{2+}) y condiciones reductoras (A), en presencia de metal correpresor (B), en presencia de condiciones reductoras (C) y en presencia de ambas condiciones (D). Se muestran las representaciones de dQ/dt vs tiempo y Q vs ratio molar ligando/proteína de los datos obtenidos en la calorimetría. Los ensayos se realizaron a 25 °C en tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,5 y se hicieron por duplicado, obteniéndose el mismo resultado.

Los ensayos de ITC mostraron que FurC también era capaz de interactuar con 2-OG y que en este caso se producía interacción en las cuatro condiciones estudiadas (Figura 14). Por ello, para determinar si existían diferencias se determinaron los parámetros termodinámicos de la interacción para cada una de las cuatro condiciones (Tabla 6).

	K (M⁻¹)^a	K_d (μM)^a	ΔH (kcal/mol)^b	n
FurC	8,5 · 10 ⁴	12	-17,3	0,5
FurC +Mn ²⁺	4,5 · 10 ⁵	2,2	-7,6	0,5
FurC +DTT	3,1 · 10 ⁵	3,2	-9,5	0,5
FurC +Mn ²⁺ +DTT	8,4 · 10 ⁵	1,2	-14,5	0,5

Tabla 6. Parámetros termodinámicos para la interacción de FurC con 2 OG en ausencia de condiciones reductoras y metal correpresor, en presencia de metal correpresor, en presencia de condiciones reductoras y en presencia de ambas condiciones. Los datos se obtuvieron a 25 °C en tampón acético acetato pH=4. ^aEl error relativo en los valores de K y K_d es del 15 %. ^bEl error absoluto en el valor de ΔH es de 0,4 kcal/mol.

Se obtuvo que, aunque en este caso el 2-OG era capaz de unirse a la proteína en las cuatro condiciones estudiadas, la afinidad era más alta en las condiciones en las que el regulador transcripcional es activo, con una constante de disociación de K_d=1,2 μM y una entalpía de ΔH=-14,5 kcal/mol. En ausencia de ambas condiciones la afinidad se veía considerablemente afectada, pues la constante de disociación adquiriría un valor de K_d=12 μM, diez veces menor al anterior. Por su parte en ausencia de metal correpresor o de condiciones reductoras, la afinidad solo disminuía ligeramente, con valores de K_d=3,2 μM y K_d=2,2 μM respectivamente. Sin embargo, sí que se observaba que la entalpía era menos favorable, pues presentaba valores de ΔH= -9,5 kcal/mol en ausencia de metal correpresor y ΔH= -7,6 kcal/mol en ausencia de condiciones reductoras. Dado que el valor de la entalpía es un indicativo del número y calidad de las interacciones que se establecen entre la proteína y el ligando estos valores indican que aunque la afinidad sea similar, la interacción que se produce es peor que la que tiene lugar en presencia de ambas condiciones. Por tanto, estos resultados en su conjunto sugieren que aunque la interacción no precisaba de las condiciones en las que el regulador transcripcional es activo, sí que dependía notablemente de la presencia de las mismas. Además, al igual que sucedía con FurA, la estequiometría observada fue de 0,5 para todas las condiciones, lo que de nuevo sugería la posibilidad de que una molécula de 2-OG se uniera a un dímero de proteína.

5.3.2. Efectos del 2-OG sobre la función biológica de FurA y FurC

Una vez que se había determinado que el 2-OG era capaz de unirse a FurA y FurC se quiso determinar si esta unión tenía algún efecto sobre su actividad biológica, para lo cual se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel en presencia de 2-OG.

5.3.2.1. Estudio de la actividad de unión al DNA de FurA en presencia de 2-OG

FurA es un regulador global que juega un papel clave procesos celulares como el metabolismo del nitrógeno o el control de la homeostasis del hierro (52). Por ello, para determinar si el 2-OG modulaba la actividad de unión al DNA de FurA se seleccionaron dos genes diana como representativos de ambos procesos, el promotor del regulador del metabolismo del nitrógeno *NtcA* y el promotor de la flavodoxina (*isiB*), que se induce como respuesta a la deficiencia de hierro. Estos genes contenían cajas de unión de FurA en sus promotores (69) y estudios previos habían demostrado que eran dianas directas del regulador transcripcional (55,66), siendo necesarias la presencia de condiciones reductoras y del metal correpresor para la unión de FurA a sus regiones promotoras (54). Se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con ambos promotores en presencia y ausencia de 0,8 mM de 2-OG, cuyos resultados se muestran en la figura 15. Se eligió ese valor de concentración de 2-OG porque estudios previos mostraron que esa concentración tenía efectos sobre la actividad de unión al DNA de *NtcA* (46).

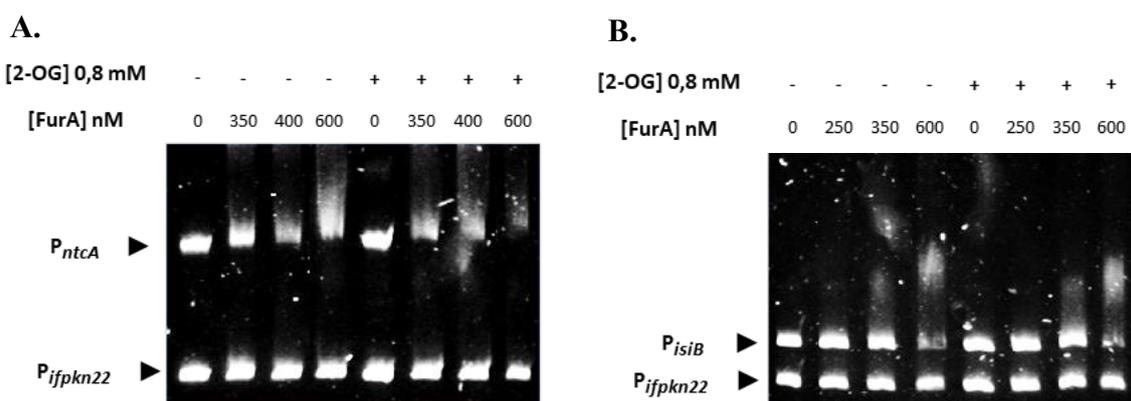


Figura 15. Efecto del 2-OG en la unión de FurA a las regiones promotoras de *ntcA* e *isiB*. **A.** Ensayo de retardo en gel de FurA con la región promotora de *ntcA* empleando concentraciones crecientes de FurA (350, 400 y 600 nM) y ausencia (-) o presencia (+) de 0,8 mM de 2-OG. **B.** Ensayo de retardo en gel de FurA con la región promotora de *isiB* empleando concentraciones crecientes de FurA (250, 350 y 600 nM) y ausencia (-) o presencia (+) de 0,8 mM de 2-OG. En ambos casos el carril 1 corresponde al promotor libre, los carriles 2, 3 y 4 al promotor con concentraciones crecientes de FurA, el carril 5 al promotor libre con 0,8 mM de 2-OG y los carriles 6, 7 y 8 al promotor con 0,8 mM de 2-OG y concentraciones crecientes de FurA. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurA y 2-OG se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

Como se puede observar en la figura 15A la presencia de 2-OG incrementaba la actividad de unión de FurA a la región promotora de *ntcA* para todas las concentraciones de proteína analizadas. Sin embargo este efecto no se observaba para el promotor de la flavodoxina, donde la presencia de 2-OG no tenía efectos sobre la actividad de unión al DNA de FurA (Figura 15B)

Dado que los niveles de 2-OG en el citoplasma de la célula varían dependiendo del balance carbono/nitrógeno también se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con diferentes concentraciones de 2-OG (0,3, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 mM), cuyos resultados se muestran en la figura 16.

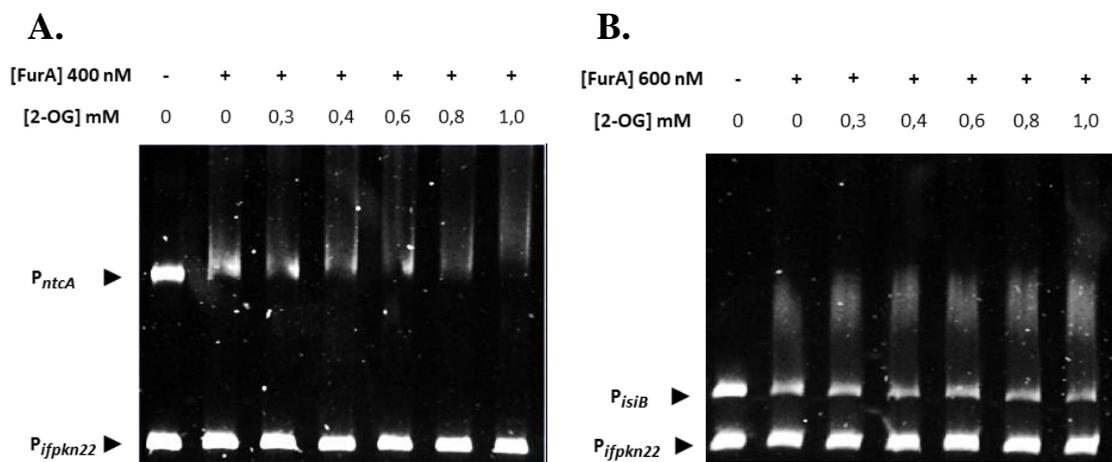


Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de 2-OG en la unión de FurA a las regiones promotoras de *ntcA* e *isiB*. **A.** Ensayo de retardo en gel de FurA con la región promotora de *ntcA* empleando 400 nM de FurA y concentraciones crecientes de 2-OG (0,3, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mM). **B.** Ensayo de retardo en gel de FurA con la región promotora de *isiB* empleando 600 nM de FurA y concentraciones crecientes de 2-OG (0,3, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 mM). En ambos casos el carril 1 corresponde al promotor libre, el carril 2 al promotor en presencia de FurA y los carriles 3, 4, 5, 6 y 7 al promotor en presencia de FurA y concentraciones crecientes de 2-OG. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurA y 2-OG se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

Como se puede observar en la figura 16 concentraciones crecientes de 2-OG incrementaban ligeramente la unión de FurA a la región promotora de *ntcA* (Figura 16A) pero no tenían efecto sobre la unión a la región promotora de la flavodoxina (Figura 16B). La razón por la cual se empleó una concentración de 400nM para el promotor de *ntcA* y de 600nM para el de *isiB* fue que a estos valores de concentración se producía un retardo moderado que permitía determinar si el 2-OG incrementaba o no la unión de FurA a estos promotores.

Estos resultados sugieren que aunque el 2-OG incrementa la actividad de unión al DNA de FurA el efecto no se produce en todos los promotores de los genes que regula. En concreto se ha puesto de manifiesto que un incremento en los niveles de 2-OG en el interior celular aumentaría la actividad de unión de FurA a la región promotora de *ntcA* y por tanto la represión de este gen, mientras que no tendría efecto en su unión a otros promotores, como el del gen *isiB*, y por tanto no afectaría a su nivel de expresión. Así se puede proponer que FurA actuaría como un potencial sensor del balance carbono/nitrógeno, pues es capaz de unirse al 2-OG y su unión a la región promotora del regulador clave del metabolismo del nitrógeno *ntcA* esta modulada por los niveles de 2-OG.

5.3.2.2. Estudio de la actividad de unión al DNA de FurC en presencia de 2-OG

En este estudio se había determinado que FurC también era capaz de interactuar con 2-OG por lo que se quiso determinar si esta interacción tenía algún efecto sobre su actividad de unión al DNA. Dado que los resultados anteriores sugerían que el efecto dependía del promotor diana se seleccionaron cuatro unidades transcripcionales que mostraron ser dianas directas de FurC: dos implicadas en diferenciación de heterocistos y dos implicadas en metabolismo y fijación del nitrógeno. En concreto se analizó el efecto del 2-OG sobre los promotores del operon *nirA-nrtABCD-narB*, implicado en la asimilación de nitrato y nitrito; el gen *hetR*, que codifica para el regulador del desarrollo de heterocistos; el gen *nifH2*, que codifica para el componente dinitrogenasa de una nitrogenasa alternativa; y el gen *hetZ* que codifica para un regulador transcripcional esencial para la diferenciación a heterocistos. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de 0,8 mM de 2-OG empleando una concentración de FurC de 600 nM para que el retardo de los promotores fuera moderado (Figura 17)

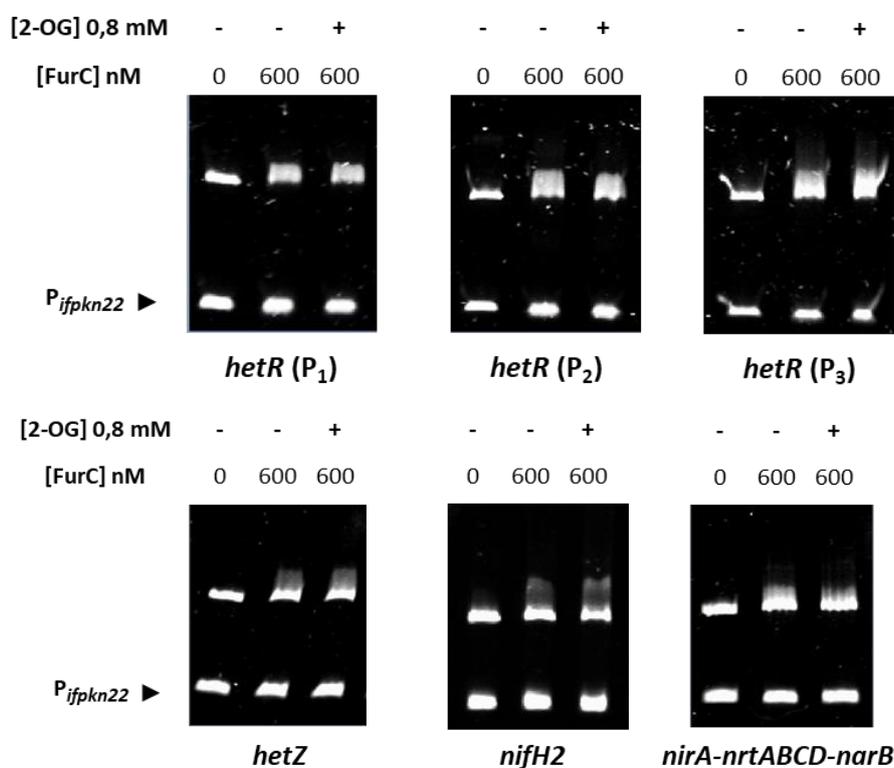


Figura 17. Efecto del 2-OG en la unión de FurC a las regiones promotoras de *hetR*, *hetZ*, *nifH2* y *nirA-nrtABCD-narB*. El carril 1 corresponde al promotor libre, el carril 2 al promotor incubado con FurC a 600 nM y el carril 3 al promotor incubado con FurC a 600 nM y 0,8 mM de 2-OG. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC y 2-OG se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6% y cada ensayo se realizó por triplicado, obteniendo siempre el mismo resultado.

Como se refleja en la figura 17 estos ensayos mostraron que la presencia de 2-OG no tenía efecto sobre la unión de FurC a los promotores de estas unidades transcripcionales, por lo que no se pudo determinar que el 2-OG tuviera efecto sobre la actividad de unión al DNA de FurC. No obstante, todavía es necesario estudiar los efectos de este metabolito sobre la unión de FurC a otros promotores o si la interacción entre FurC y el 2-OG tiene otras implicaciones.

5.4. Discusión global

5.4.1 Participación de FurC en la regulación del metabolismo del nitrógeno en *Anabaena* PCC7120

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que FurC juega un papel clave en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120, ya que regula de forma directa genes implicados en este proceso. En concreto FurC estaría participando a dos niveles diferentes: en la asimilación de nitrógeno fijado y en la formación del heterocisto.

Con respecto a la asimilación de nitrógeno fijado se ha puesto de manifiesto que FurC activa genes como el operón *nirA-nrtABCD-narB*, implicado en la asimilación de nitrato y nitrito, y las nitrilo hidratatas All2026 y All2027, implicadas en la asimilación de grupos nitrilo. Estos genes solo se expresan cuando en el interior celular existe un déficit de compuestos nitrogenados, de modo que es necesario que FurC sea capaz de activar su expresión específicamente en estas condiciones. Aunque en este trabajo se ha puesto de manifiesto que FurC es capaz de interactuar con 2-OG no ha sido posible determinar en qué medida esta interacción afectaba a su función biológica. Sin embargo previamente se había descrito que FurC estaba regulado de forma directa por NtcA (69), otro regulador transcripcional cuya actividad aumenta en presencia de 2-OG. Por ello una posible explicación para la expresión de estos genes en condiciones de deficiencia de nitrógeno sería el control que NtcA ejerce sobre la expresión de FurC. Así, en condiciones de deficiencia de nitrógeno se produciría un incremento en los niveles de 2-OG, lo que daría lugar a un aumento en la actividad de NtcA. NtcA aumentaría la expresión de la glutamina sintetasa, permitiendo la incorporación de amonio a esqueletos carbonados, y activaría la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes de nitrógeno fijado no solo de forma directa, sino también de forma indirecta a través de FurC. Algunos genes, como los de las nitrilo hidratatas, solo se activarían de forma indirecta a través de FurC, mientras que otros como el operón *nirA-nrtABCD-narB*, se activarían tanto de forma directa por NtcA como de forma indirecta a través de FurC, lo que supondría un punto de regulación adicional que permitiría controlar su expresión de forma más precisa. Un esquema del mecanismo propuesto se recoge en la figura 18.

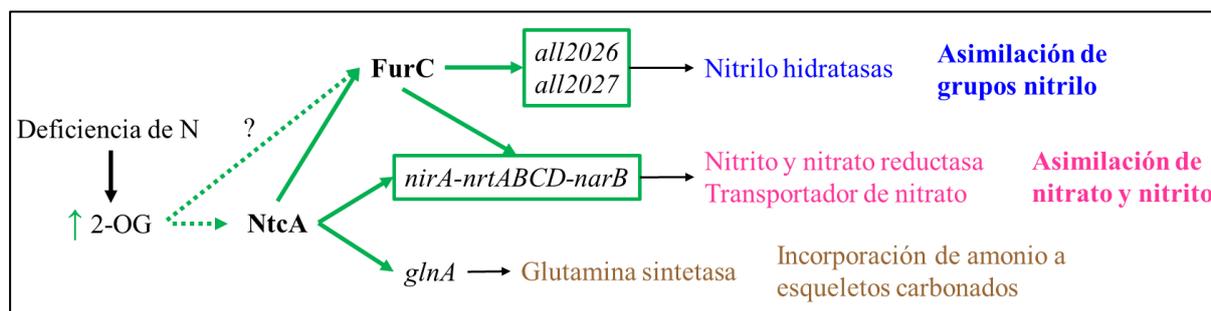


Figura 18. Representación esquemática del posible papel de FurC en la asimilación de nitrógeno fijado en *Anabaena* PCC7120. El aumento en la actividad de proteínas se representa con flechas verdes punteadas y la activación de la expresión de genes se representa con flechas verdes sólidas. Los genes que en este estudio se ha determinado que están regulados de forma directa por FurC aparecen recuadrados

Por su parte en el proceso de formación de heterocistos los resultados sugieren que FurC participaría en tres etapas diferentes, pues se ha determinado que regula (i) genes que permiten que comience el proceso de diferenciación de los heterocistos como *hetZ*; (ii) genes implicados en la síntesis de la envuelta de glicolípidos y polisacáridos, como los genes que codifican para el transportador de polisacáridos HepA, la glucosiltransferasa HepC, el transportador de glicolípidos y polisacáridos DevBCA, la glucolípidos sintasa HglE y el regulador de respuesta de la síntesis de glicolípidos HenR; y (iii) genes implicados en la síntesis del complejo de la nitrogenasa y sus componentes accesorios. En esta última etapa FurC activaría al operón *xisHI*, que codifica para dos proteínas que controlan a la recombinasa XisF permitiendo la expresión de la ferredoxina del heterocisto, y reprimiría la expresión del gen *nifH2*, lo que permitiría explicar por qué esta nitrogenasa alternativa, que se piensa que es un vestigio evolutivo, no se expresa en el heterocisto (28). Un esquema del papel de FurC en la formación de heterocistos se recoge en la **figura 19**.

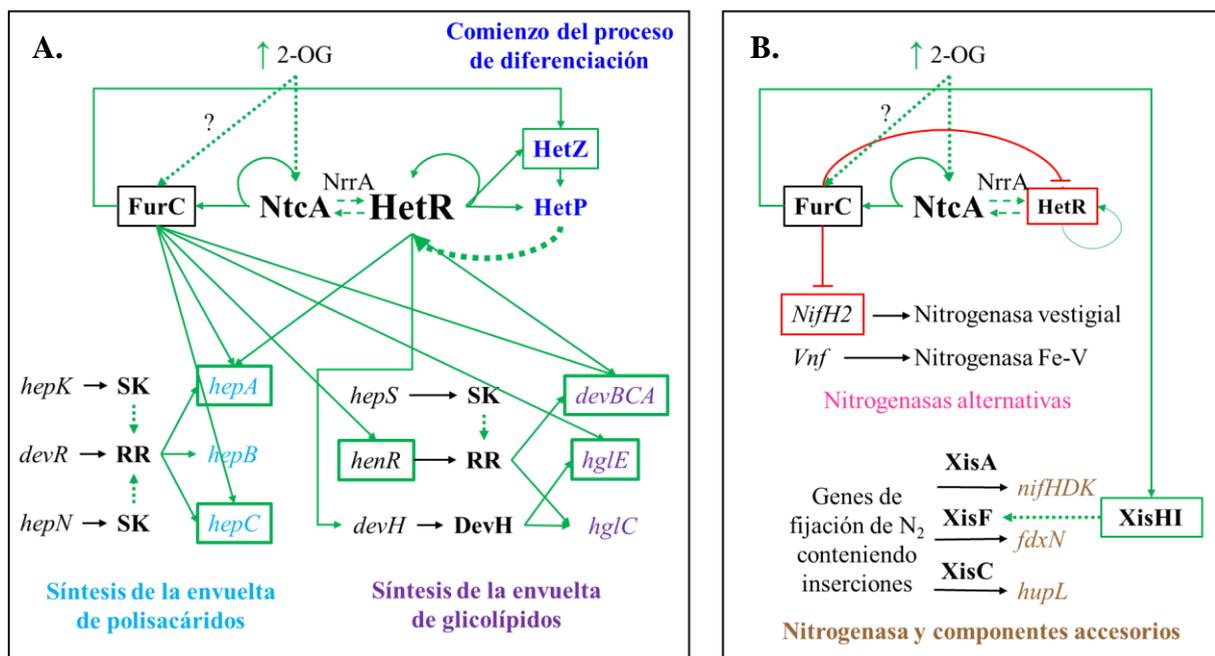


Figura 19. Representación esquemática del posible papel de FurC en la formación de heterocistos en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120. **A.** Diferenciación y maduración del heterocisto **B.** Síntesis del complejo de la nitrogenasa y sus componentes accesorios. El aumento en la actividad de proteínas se representa con flechas verdes punteadas, la activación de la expresión de genes se representa con flechas verdes sólidas y la represión de genes con líneas rojas terminadas en barras. Los genes que en este estudio se ha determinado que están regulados de forma directa por FurC aparecen recuadrados.

No obstante, los trabajos experimentales abren un amplio campo de nuevas hipótesis que deberán ser estudiadas. Como se ha comentado anteriormente la expresión de FurC está controlada por NtcA y varios de los genes que activa, como *hetZ*, *hepA* y *devBCA*, están también activados por HetR. Por ello es posible que FurC este colaborando con HetR en la activación de genes implicados en la diferenciación de los heterocistos, permitiendo su expresión en el momento adecuado y en los niveles requeridos para que el proceso tenga lugar correctamente.

Además en este trabajo se ha determinado que FurC actúa como represor del gen *hetR*, un gen cuya expresión se incrementa al comienzo del proceso de diferenciación de heterocistos y disminuye una vez que la diferenciación ha terminado (29). En estudios anteriores ya se había descrito que otra de las proteínas Fur de *Anabaena* PCC7120, FurA, actuaba como represor del gen *ntcA*, el otro regulador clave en el proceso de diferenciación de heterocistos. Dado que la expresión de *furA* se induce durante la formación de heterocistos, permaneciendo alta en heterocistos maduros (67), se propuso que FurA podría colaborar con otras señales para permitir que los niveles de NtcA disminuyan una vez que se ha formado el heterocisto. Esto es un proceso muy frecuente y se conoce como “señal de parada” o “*arrest*”. Por ello, en base a los resultados obtenidos, se puede proponer que FurC actuaría de forma análoga, reprimiendo la expresión de *hetR* al final del proceso de diferenciación y permitiendo así que los niveles de HetR disminuyan cuando la formación del heterocisto ha finalizado. No obstante para demostrar esta hipótesis sería necesario al menos medir la expresión de ambos genes a lo largo del tiempo durante la formación de heterocistos, de modo que si fuera cierta sería esperable observar primero un aumento en la expresión de *furC* y posteriormente una disminución en la expresión de *hetR*.

El papel de FurC en la formación de heterocistos también se pone de manifiesto en los estudios morfológicos. Se observó que la estirpe EB2770FurC no era capaz de diferenciar heterocistos y que esto tenía diversas implicaciones fisiológicas, principalmente consistentes en una mayor degradación de las ficobiliproteínas para ser utilizadas como fuente de nitrógeno. La formación de heterocistos es un proceso que requiere la expresión secuencial de varios genes. Por ello, dado que FurC regula de forma directa genes implicados en la diferenciación de heterocistos, la sobreexpresión de este regulador transcripcional posiblemente esté ocasionando una desregulación global de los genes implicados en la diferenciación del heterocisto que impidan la formación de este tipo celular.

Finalmente, los resultados anteriores también indican que FurC podría ser un regulador global en cianobacterias. Inicialmente se estableció que FurC podría ser el regulador PerR de *Anabaena* PCC7120 (62) y que regularía las respuestas frente al estrés oxidativo. Sin embargo estudios más recientes propusieron que en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 FurC sería un regulador global, pues se observó que regulaba genes implicados en la fotosíntesis y la división celular (63). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis, pues se ha determinado que FurC también regula el metabolismo del nitrógeno y la formación de heterocistos. Además estos resultados en su conjunto también sugieren que, al igual que sucede con otros parálogos de Fur (82), FurC puede actuar como un regulador dual, siendo en algunos casos activador de genes, como sucede con los genes implicados en la formación de la envuelta de polisacáridos y glicolípidos, y en otros casos represor, como sucede con los genes *hetR* y *nifH2*.

5.4.2 Las proteínas Fur como sensores del balance carbono/nitrógeno

En este trabajo se ha determinado que tanto FurA como FurC son capaces de unirse al 2-OG, lo que supone la primera evidencia de la unión de este metabolito a las proteínas Fur. En el caso de FurA se ha determinado que esta interacción afecta a su capacidad de unión al DNA, pero para FurC no ha sido posible determinar los efectos biológicos de esta interacción. Sin embargo todavía es necesario llevar a cabo ensayos con regiones promotoras de otros genes regulados por FurC o determinar si afecta a otros niveles diferentes a la capacidad de unión al DNA, como a su interacción con otras proteínas. En concreto, estudios previos han descrito que FurC es capaz de interaccionar con los otros parálogos de proteínas Fur en *Anabaena* PCC7120 (54), de modo que es posible que la unión del 2-OG a FurC afecte a su capacidad de interaccionar con FurA y FurB, de forma análoga a lo que sucede entre PII y PipX (43).

Previamente ya se había descrito que el 2-OG potenciaba la actividad de unión de reguladores transcripcionales al DNA, en concreto de NtcA. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que el 2-OG potencia la unión de FurA a la región promotora de *ntcA* pero no a la región promotora de *isiB*, sugiriendo que el efecto del 2-OG sobre la actividad de unión al DNA de FurA depende del promotor diana. Estos resultados son semejantes a los observados para NtcA, en el que el 2-OG incrementa la actividad de unión en distinta medida dependiendo del promotor diana (83). No obstante es necesario llevar a cabo mucho más trabajo experimental para apoyar esta hipótesis.

Como ya se ha comentado, estudios previos propusieron que FurA podría reprimir la expresión de *ntcA* al final del proceso de diferenciación de heterocistos (66), permitiendo que los niveles de NtcA disminuyan cuando se ha formado el heterocisto. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la existencia de un nivel de regulación adicional, consistente en que la represión que FurA ejerce sobre la expresión de *ntcA* es dependiente de los niveles de 2-OG. Así, el aumento en los niveles de FurA durante la diferenciación de heterocistos sumado a los altos niveles de 2-OG permitiría a FurA unirse a la región promotora de *ntcA* con gran afinidad, reprimiendo su expresión al final del proceso de diferenciación y por tanto permitiendo que disminuyan los niveles de NtcA cuando la formación de heterocistos ha finalizado.

En su conjunto, estos resultados tienen gran interés, pues permiten proponer a las proteínas FurC y FurA de *Anabaena* PCC7120 como potenciales sensores del balance carbono/nitrógeno a través de su interacción con 2-OG, aunque en el caso de FurC no ha sido posible determinar las implicaciones biológicas de esta interacción. Además, es necesario comprobar si el incremento en la actividad de unión al DNA de FurA en presencia de 2-OG se produce para otras regiones promotoras además de la de *ntcA* y si es específico para genes del metabolismo del nitrógeno o se produce también en genes de otras categorías funcionales. No obstante los resultados refuerzan la propuesta de que FurA no solo actúa como un regulador transcripcional, sino también como una proteína sensora capaz de integrar diferentes señales: la disponibilidad de hierro, el estado redox a través de la interacción con el grupo hemo y su actividad disulfuro reductasa (56–58) y el balance carbono/nitrógeno a través de la interacción con 2-OG.

6. Conclusiones

Tras la realización del estudio se obtienen las siguientes conclusiones:

- FurC regula de forma directa genes implicados en la asimilación de nitrógeno y en la diferenciación de heterocistos.
- La sobreexpresión de FurC impide la formación de heterocistos en condiciones de diazotrofia, lo que pone de manifiesto que este regulador transcripcional desempeña funciones relevantes en el desarrollo de los heterocistos.
- FurC se postula como un regulador global en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 y con una posible función dual, actuando como activador y represor de genes.
- FurA y FurC son potenciales sensores del balance carbono/nitrógeno, ya que ambos son capaces de interactuar con 2-OG y, en el caso de FurA, esta interacción afecta a su capacidad de unión a la región promotora de *ntcA*.

Conclusions

From the results obtained in this work we can conclude that:

- FurC directly regulates genes involved in nitrogen assimilation and heterocyst differentiation.
- Overexpression of FurC suppresses heterocyst formation in diazotrophic conditions, revealing that this transcriptional regulator performs relevant roles in heterocyst development.
- FurC seems to be a global regulator in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120 and display a global role, acting both as repressor and as activator of gene expression.
- FurA and FurC are potential carbon/nitrogen balance sensors, since both are able to interact with 2-OG and, in the case of FurA, this interaction affects its capacity to bind to the *ntcA* promoter region.

7. Bibliografía

1. Whitton BA, Potts M. Introduction to the Cyanobacteria. En: Whitton BA, Potts M, editores. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Dordrecht: Springer Netherlands; 2002. p. 1-11.
2. Stanier RY, Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:225-74.
3. Martin W, Kowallik K. Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *Eur J Phycol.* 1999;34(3):287-95.
4. Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics.* 2012;13:56.
5. Bothe H, Schmitz O, Yates MG, Newton WE. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):529-51.
6. Paerl HW, Otten TG. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb Ecol.* 2013;65(4):995-1010.
7. Stanier G. Fine structure of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 1988; 167:157-72.
8. van de Meene AML, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WFJ, Roberson RW. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol.* 2006;184(5):259-70.
9. MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol.* 1998;124(2-3):311-34.
10. Herdman M, Rippka R. Cellular differentiation: hormogonia and baeocytes. *Methods Enzymol.* 1988; 167:232-42.
11. Meeks JC, Campbell EL, Summers ML, Wong FC. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Arch Microbiol.* 2002;178(6):395-403.
12. Meeks JC, Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(1):94-121.
13. Herdman M. Cellular differentiation: Akinetes. *Methods Enzymol.* 1988; 167:222-32.
14. Wolk CP, Ernst A, Elhai J. Heterocyst Metabolism and Development. En: Bryant DA, editor. *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1994. p. 769-823.
15. Gallon JR. Reconciling the incompatible: N₂ fixation And O₂. *New Phytol.* 1992;122(4):571-609.
16. Vázquez-Bermúdez MF, Paz-Yepes J, Herrero A, Flores E. The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiol Read Engl.* 2002;148(Pt 3):861-9.
17. Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res.* 2005;83(2):135-50.
18. Omata T, Andriessse X, Hirano A. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol Gen Genet.* 1993;236(2-3):193-202.
19. Omata T. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol.* 1995;36(2):207-13.

20. Sakamoto T, Inoue-Sakamoto K, Bryant DA. A novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J Bacteriol.* 1999;181(23):7363-72.
21. Flores E, Frías JE, Rubio LM, Herrero A. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res.* 2005;83(2):117-33.
22. Vígara AJ, Inda LA, Vega JM, Gómez-Moreno C, Peleato ML. Flavodoxin as an Electronic Donor in Photosynthetic Inorganic Nitrogen Assimilation by Iron-deficient *Chlorella fusca* Cells. *Photochem Photobiol.* 1998;67(4):446-9.
23. Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol.* 2001;183(2):411-25.
24. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 1995;59(3):451-80.
25. Valladares A, Montesinos ML, Herrero A, Flores E. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol Microbiol.* 2002;43(3):703-15.
26. Flores E, Herrero A. Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation. En: Bryant DA, editor. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1994. p. 487-517.
27. Quintero MJ, Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E. Arginine Catabolism in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Involves the Urea Cycle and Arginase Pathway. *J Bacteriol.* 2000;182(4):1008-15.
28. Thiel T, Pratte BS. Regulation of Three Nitrogenase Gene Clusters in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Life Basel Switz.* 2014;4(4):944-67.
29. Herrero A, Flores E. *Developmental Biology in Cyanobacteria*. Life Basel Switz. 2019;9(2).
30. Ehira S, Ohmori M. NrrA directly regulates expression of *hetR* during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2006;188(24):8520-5.
31. Muro-Pastor AM, Hess WR. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol.* 2012;20(11):548-57.
32. Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(4):469-87.
33. Borthakur PB, Orozco CC, Young-Robbins SS, Haselkorn R, Callahan SM. Inactivation of *patS* and *hetN* causes lethal levels of heterocyst differentiation in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol.* 2005;57(1):111-23.
34. Orozco CC, Risser DD, Callahan SM. Epistasis Analysis of Four Genes from *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 Suggests a Connection between PatA and PatS in Heterocyst Pattern Formation. *J Bacteriol.* 2006;188(5):1808-16.
35. Flores E, Picossi S, Valladares A, Herrero A. Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2019;1862(7):673-84.
36. Herrero A, Stavans J, Flores E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(6):831-54.
37. Zhang H, Wang S, Wang Y, Xu X. Functional Overlap of *hetP* and *hetZ* in Regulation of Heterocyst Differentiation in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2018;200(9).

38. Thiel T. Nitrogen Fixation in Heterocyst-Forming Cyanobacteria. En: Klipp W, Masepohl B, Gallon JR, Newton WE, editores. Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria. Dordrecht: Springer Netherlands; 2005. p. 73-110.
39. Wolk CP, Thomas J, Shaffer PW, Austin SM, Galonsky A. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. J Biol Chem. 1976;251(16):5027-34.
40. Esteves-Ferreira AA, Inaba M, Fort A, Araújo WL, Sulpice R. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. Crit Rev Microbiol. 2018;44(5):541-60.
41. Huergo LF, Dixon R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. Microbiol Mol Biol Rev. 2015;79(4):419-35.
42. Cai W, Wannemuehler Y, Dell'anna G, Nicholson B, Barbieri NL, Kariyawasam S, et al. A novel two-component signaling system facilitates uropathogenic *Escherichia coli*'s ability to exploit abundant host metabolites. PLoS Pathog. 2013;9(6):e1003428.
43. Espinosa J, Forchhammer K, Burillo S, Contreras A. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. Mol Microbiol. 2006;61(2):457-69.
44. Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. Mol Microbiol. 1992;6(13):1853-9.
45. Ramasubramanian TS, Wei TF, Golden JW. Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. J Bacteriol. 1994;176(5):1214-23.
46. Vázquez-Bermúdez MF, Herrero A, Flores E. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. FEBS Lett. 2002;512(1-3):71-4.
47. Coy M, Neilands JB. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. Biochemistry. 1991;30(33):8201-10.
48. Hantke K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. Mol Gen Genet. 1981;182(2):288-92.
49. Lee J-W, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med. 2007;20(3-4):485-99.
50. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. Arch Biochem Biophys. 2014;546:41-52.
51. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev. 2003;27(2-3):215-37.
52. González A, Bes MT, 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 Cell Physiol. 2010;51(11):1900-14.
53. González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. PloS One. 2016;11(3):e0151384.

54. Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(2):275-82.
55. Hernández JA, López-Gomollón S, Muro-Pastor A, Valladares A, Bes MT, Peleato ML, et al. Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2006;19(3):259-68.
56. Pellicer S, González A, Peleato ML, Martínez JI, Fillat MF, Bes MT. Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *FEBS J.* 2012;279(12):2231-46.
57. Botello-Morte L, Bes MT, Heras B, Fernández-Otal Á, Peleato ML, Fillat MF. Unraveling the redox properties of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: disulfide reductase activity based on its CXXC motifs. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(9):1396-406.
58. Botello-Morte L, Pellicer S, Sein-Echaluce VC, Contreras LM, Neira JL, et al. Cysteine Mutational Studies Provide Insight into a Thiol-Based Redox Switch Mechanism of Metal and DNA Binding in FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Antioxid Redox Signal.* 2016;24(4):173-85.
59. Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2012;194(10):2426-36.
60. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J.* 2009;418(1):201-7.
61. Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, et al. Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol.* 2015;17(6):2006-17.
62. Yingping F, Lemeille S, Talla E, Janicki A, Denis Y, al. Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (*alr0957*) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Environ Microbiol Rep.* 2014;6(5):468-75.
63. Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, et al. Regulation by FurC in *Anabaena* links the oxidative stress response to photosynthetic metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2019;
64. González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis. *J Proteomics.* 2011;74(5):660-71.
65. González A, Angarica VE, Sancho J, Fillat MF. The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: in silico prediction and experimental validation of novel target genes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(8):4833-46.
66. González A, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF. FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* 2013;587(16):2682-90.
67. López-Gomollón S, Hernández JA, Wolk CP, Peleato ML, Fillat MF. Expression of *furA* is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiol Read Engl.* 2007;153(Pt 1):42-50.

68. Picossi S, Flores E, Herrero A. ChIP analysis unravels an exceptionally wide distribution of DNA binding sites for the NtcA transcription factor in a heterocyst-forming cyanobacterium. *BMC Genomics*. 2014;15:22.
69. López-Gomollón S, Hernández JA, Pellicer S, Angarica VE, Peleato ML, Fillat MF. Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons. *J Mol Biol*. 2007;374(1):267-81.
70. Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *J Appl Microbiol*. 2009;106(1):1-12.
71. Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol*. 1988;167:3-27.
72. Brosset, E. Rol de FurC en *Anabaena* sp. PCC7120. Trabajo Fin de Máster. Repositorio Facultad de Ciencias. 2012
73. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*. 1979;111(1):1-61.
74. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.*: Cold Spring Harbour Laboratory Press
75. Pellicer S, Bes MT, González A, Neira JL, Peleato ML, Fillat MF. High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment. *Process Biochem*. 2010;45(2):292-6.
76. Marker AFH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshw Biol*. 1972;2(4):361-85.
77. Bryant DA, Glazer AN, Eiserling FA. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch Microbiol*. 1976;110(1):61-75.
78. Taylor RF, Davies BH. Triterpenoid carotenoids and related lipids. The triterpenoid carotenes of *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem J*. 1974;139(3):751-60.
79. Liotenberg S, Campbell D, Rippka R, Houmard J, de Marsac NT. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiol Read Engl*. 1996;142(3):611-622.
80. Howden AJM, Harrison CJ, Preston GM. A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *Plant J Cell Mol Biol*. 2009;57(2):243-53.
81. Yancheva S, Georgieva L, Kostova M, Halkoglu P, Dimitrova M, Naimov S. Plant Pigments Content as a Marker for Herbicide Abiotic Stress in Corn (*Zea mays* L.). *Emir J Food Agr*. 2016;28(5):332
82. Delany I, Rappuoli R, Scarlato V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 2004;52(4):1081-90.
83. Valladares A, Flores E, Herrero A. Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol*. 2008;190(18):6126-33.
84. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Material suplementario

ANEXO I: Material suplementario

8.1. Programa para las reacciones de PCR

1. Desnaturalización inicial del DNA: 5 min a 95 °C
 2. Desnaturalización del DNA: 30 s a 95 °C
 3. Hibridación del DNA: 30 s a una temperatura 2 °C inferior a la T_m de cada par de cebadores
 4. Etapa de elongación: 45 s a 72 °C
 5. Elongación final: 10 min a 72 °C
 6. Conservación: a 4 °C
- } 30 ciclos

La temperatura de hibridación (T_m) dependió de la pareja de oligonucleótidos empleados, siendo siempre 2 °C inferior a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. En la sección 8.2 de Material Suplementario se detalla tanto la T_m como la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

8.2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de promotores mediante PCR

Los primers empleados para amplificar las regiones promotoras de los genes de interés se diseñaron empleando el servidor Tm Calculator (New England Biolabs) (<https://tmcaculator.neb.com/>) y fueron suministrados por Invitrogen o Biomers. Las secuencias de las regiones promotoras se obtuvieron a partir de la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>).

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Secuencia amplificada
PhetZ fw	GCGTTTAGTTTATCCGCAAA	61	Promotor del gen <i>hetZ</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetZ rv	CTCAAGCATTGTTGTAGCCG		
PhenR fw	TTCCTTGAACCAAGATTTGC	61	Promotor del gen <i>henR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhenR rv	AACAAGCACCCAGTTACCTC		
Palr3646-48 fw	CTTTCTATACGGTGTCAAGTTTAC	61	Promotor del operon <i>alr3646-48</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Palr3646-48 rv	GTTCTTTCCGATATTGGTCATG		
Palr4973-75 fw	CACCTCGGACACAATCAAAC	62	Promotor del operon <i>alr4973-75</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Palr4973-75 rv	GAGATTCCTGAATCGGTCTG		
PhglE fw	TAAGGACAATAGAAGATATCCTAC	59	Promotor del gen <i>hglE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhglE rv	CAATAGGTGTTTGTGTAAAGC		
PhepC1 fw	GCCAATTAAGTTGTCATGATTAAG	38	Región 1 del promotor del gen <i>hepC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhepC1 rv	CCTAACCTTTGTAATATCCGCC		
PhepC2 fw	GGCGGATATTACAAAGGTTAG	46	Región 2 del promotor del gen <i>hepC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhepC2 rv	CGCTTGCATAATGTCTTTGG		
PxisHI fw	GCAGAATGTGGCTTTACTAC	61	Promotor del operon <i>xisHI</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PxisHI rv	GAGCTGTTCTCACGATGTTATG		
PnifH2 fw	CCACTGTAGCCACTCTTAAG	60	Promotor del gen <i>nifH2</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PnifH2 rv	CTTTACCGTAGAAAGCAATTTG		
Pnir-nrt-nar fw	GGAAGGTGTTGACATCTATATG	60	Promotor del operon <i>nirA-nrtABCD-narB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Pnir-nrt-nar rv	GAAATTTTCTTCTGGAAACGTG		
Pall2026 fw	TTTGTAATTCCTGCACGCC	62	Promotor del gen <i>all2026</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Pall2026 rv	GTGCTTCAATTTCTTTACGAGTC		
Pall2027 fw	CAAACATTTCTCTGAAGAAGCTG	62	Promotor del gen <i>all2027</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Pall2027 rv	GATTTGTGCTTCAACATCTTTACGAG		
PhetR1 fw	GGGAAAGTCCTTGTAGTTAC	52	Región 1 del promotor del gen <i>hetR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetR1 rv	CGCTTGATCAGATCGATG		
PhetR2 fw	GTCTATAATTTCCCTCCAG	54	Región 2 del promotor del gen <i>hetR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetR2 rv	CTAATAAGTAACCTACAAG		
PhetR3 fw	AACCCTTATGACAAAGGAC	52	Región 3 del promotor del gen <i>hetR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetR3 rv	CTGGAGGGAAAATTATAG		

PhepK fw	CGCTGGTTATGAAGCTGG	48	Promotor del gen <i>hepK</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhepK rv	CCCTCAAATCTCCTTACCCTC		
PhepA1 fw	CAGTATCTGTAGGGTGCCTATC	44	Región 1 del promotor del gen <i>hepA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhepA1 rv	CTTGCTTGCTGAAATAAGTATAG		
PhepA2 fw	GGGTGAATAATGCCCTG	44	Región 2 del promotor del gen <i>hepA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhepA2 rv	CTCTTTCCAGAAGCTATTAGC		
PhetC1 fw	CATAGTTTAATTTCTGTTTGGTG	58	Región 1 del promotor del gen <i>hetC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetC1 rv	CAGATGTTCGATGTTGCTCAC		
PhetC2 fw	GCTACTAGAAATGAGGAGAGGG	58	Región 2 del promotor del gen <i>hetC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PhetC2 rv	GTGAGCAACATCGACATCTG		
PisiB fw	CTTCTCTACGTTTGCGC	50	Promotor del gen <i>isiB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PisiB rv	CATTATGACACCTGATCTTTAG		
PntcA fw	GCAATCTATACCCCTATAACCC	60	Promotor del gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
PntcA rv	CTTATCTTGTGTCACGATCATC		
Pifpkn22 fw	AAAGATGAATTACACTGGCG	47	Fragmento interno del gen <i>pkn22</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
Pifpkn22 rv	CTGCAAACACTGTGGCAGAATA		

Tabla S-1. Cebadores utilizados para amplificar los promotores de los genes de interés mediante PCR, obtenidos empleando el servidor Tm Calculator (New England Biolabs) (<https://tmcalculator.neb.com/>)

8.3. Programa de la Real Time RT-PCR y tratamiento matemático de los datos utilizado para determinar el cambio en la expresión génica

La variación de la expresión génica se determinó mediante el programa “QuantStudio Real-Time PCR Software” de la casa comercial ThermoFisher, que recoge un valor de CT determinado, lo que permite, mediante una serie de cálculos matemáticos (84), determinar el cambio que en la expresión de los genes de estudio. Los cálculos realizados fueron los siguientes:

- Se calculó la media de las réplicas técnicas
- Se calculó $\Delta CT = (CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen housekeeping})$
- Se calculó $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ muestra tratada} - \Delta CT \text{ muestra control}$
- Se obtuvo la variación de la expresión del gen o Foldchange respecto al gen “housekeeping” *rnpB*, que se calcula como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (en caso de que el valor obtenido sea menor que uno, se calcula el inverso y se cambia de signo).

El programa mediante el cual se llevó a cabo la Real Time PCR está representado en la Tabla S-2.

	40 ciclos				Curva de melting		
Temperatura (°C)	50	95	95	60	95	60	95
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s

Tabla S-2. Programa utilizado para la realización de la Real Time RT-PCR

8.4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Real Time RT-PCR

Los primers empleados en los ensayos de Real Time RT-PCR se diseñaron empleando el Software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) y fueron suministrados por Invitrogen o Biomers. Las secuencias de las regiones codificantes se obtuvieron a partir de la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>).

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Secuencia amplificada
RT_hetZ fw	CTGCGGGCGCAAACCTT	Gen <i>hetZ</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hetZ rv	CGGCGGCTTGTTTCGATAT	
RT_henR fw	GAAATGGTGACAGCCCAGACTT	Gen <i>henR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_henR rv	TCCTGTTTGCCATTTGACATCT	
RT_alr3646-48 fw	CATGACCAATATCGGAAAGAACTG	Operon <i>alr3646-48</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_alr3646-48 rv	GCGTACCTGTAGAAACATTCAAACC	
RT_alr4973-75 fw	CCGTCGAGGATATTGGCTTACT	Operon <i>alr4973-75</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_alr4973-75 rv	CCACTCGTGCATCGATATCG	
RT_hglE fw	TGCAAACATGACGGGTAACG	Gen <i>hglE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hglE rv	TTGGGCGTAAAGATTTTCGATT	
RT_hepC fw	GCACATAAACCTATTTTTCTCAGTAAACC	Gen <i>hepC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hepC rv	CCAGTCTATTAATCTCCACAACCATCT	
RT_xisHI fw	GGGAGAAAATAGCAGTTGAAATTTAAAAG	Operon <i>xisHI</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_xisHI rv	TGATAAATTGCCCAAGGTTGT	
RT_nifH2 fw	AAGCTGACTCCACCCGTTTG	Gen <i>nifH2</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_nifH2 rv	CGTTCAGCAGCCAAGTGAAG	
RT_nifJ fw	CGCCCACGGCATCAA	Gen <i>nifJ</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_nifJ rv	ACCAGCGTCCTGATTCTACCA	
RT_nir-nrt-nar fw	GACAGATATCGAAGTCATCAAGCAA	Operon <i>nirA-nrtABCD-narB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_nir-nrt-nar rv	CACCAGATGAGCCAATTTTTAAGTT	
RT_hetR fw	CGCTATGCGAGCCTTAGAAGA	Gen <i>hetR</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hetR rv	CAGTTCCTGCATGGCTTCATC	
RT_hepK fw	CGAACCCAAACCCAGTTGAC	Gen <i>hepK</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hepK rv	GTTTAGCAATTAGCCGCCACTT	
RT_hepA fw	CGCGGTGTCCGTTTATCTG	Gen <i>hepA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hepA rv	TGGTGGCTTCGTCAAGAATG	
RT_hetC fw	GCTTACAGCACCAGCCATAGC	Gen <i>hetC</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_hetC rv	GACCGTGATTTGTGTTGTTTGAC	
RT_ntcA fw	GGCCCTAGCAAATGTTTTTCG	Gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_ntcA rv	TTTATTGCGTTCAAACGTTTTTCG	
RT_rnpB fw	AGCGGAACTGGTAAAAGACCAA	Gen <i>rnpB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
RT_rnpB rv	GAGAGGTACTGGCTCGGTAAACC	

Tabla S-3. Cebadores utilizados para llevar a cabo la Real Time RT-PCR, obtenidos con el programa Prime Express 3.3 (AppliedBioSystems)

8.5. Composición de los geles de SDS-PAGE

Reactivo	Gel separador al 17 %	Gel concentrador al 5%
Agua destilada	0,36 mL	1,4 mL
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,24 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	0,25 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8 p/v)	3,4 mL	0,33 mL
SDS 10 % (p/v)	30 μ L	10 μ L
PSA 10 % (p/v)	20 μ L	10 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

Tabla S-4. Composición de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

8.6. Composición de los geles de EMSA

Reactivo	Volumen
Agua destilada	4,79 mL
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8 p/v)	2 mL
Glicerol 50 % (v/v)	1,4 mL
Running buffer 10x (30,28 g/L Tris-HCl, 142 g/L glicina, pH 8)	2 mL
PSA 10 % (p/v)	50 μ L
TEMED	30 μ L

Tabla S-4. Composición de los geles para los ensayos de retardo en gel

8.7. Sobreexpresión y purificación de FurC

Para sobreexpresar la proteína FurC en *E.coli* se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 con el plásmido pET-28a/*furC* y se llevó a cabo un ensayo de sobreexpresión, cuyo resultado se recoge en la figura S-1. En este caso se seleccionó la colonia 2, pues era la que presentaba mayor sobreexpresión.

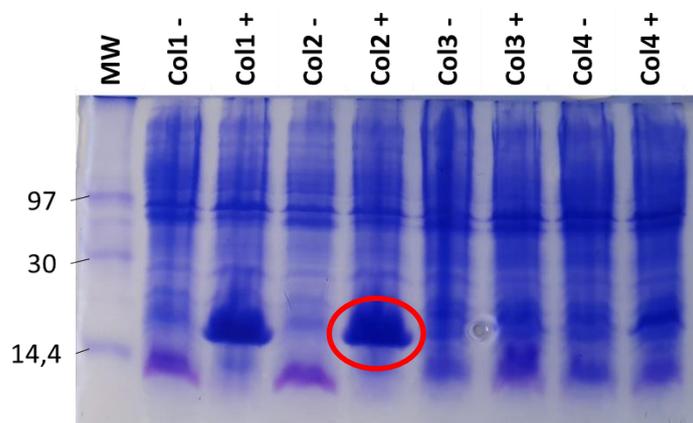


Figura S-1. Resultado del ensayo de sobreexpresión de la proteína FurC en *E.coli* BL21, visualizado mediante una electroforesis desnaturizante en gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (Low Molecular Weight Calibration kit, GE Healthcare), algunas de cuyas bandas aparecen señaladas, indicando su peso en kDa y el resto de carriles contienen los extractos celulares de cada cultivo sin inducir (-) e inducidos con 1 mM de IPTG (+). La banda correspondiente a la proteína de interés en la colonia seleccionada aparece rodeada en rojo.

A continuación se llevó a cabo la producción de biomasa y la purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa. Tras finalizar la purificación se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna de purificación para determinar en cuales se encontraba la proteína de interés (figura S-2). En este caso las fracciones seleccionadas fueron las fracciones 35-45, que se combinaron y se dializaron.

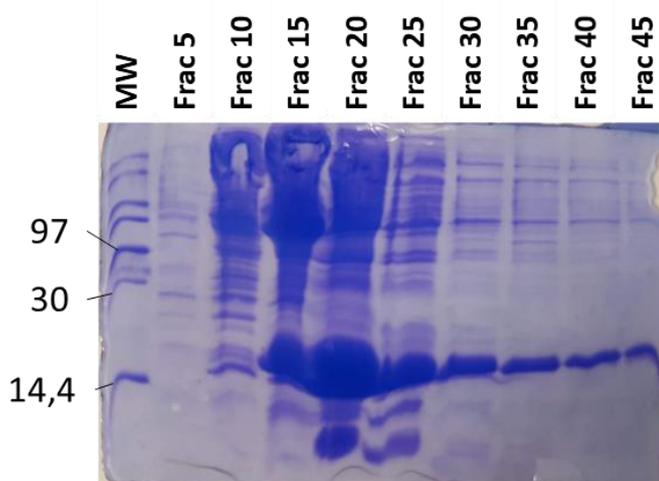


Figura S-2. Fracciones eluidas de la columna de purificación para la proteína FurC, visualizadas mediante una electroforesis desnaturizante en gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (Low Molecular Weight Calibration kit, GE Healthcare), algunas de cuyas bandas aparecen señaladas, indicando su peso en kDa y el resto de carriles contienen las diferentes fracciones de la purificación.

Tras la diálisis se llevó a cabo una cuantificación de la proteína, obteniendo un valor de 25 μM y se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel con la región promotora de *prxA* (figura S-3) que permitió determinar que la proteína estaba activa.

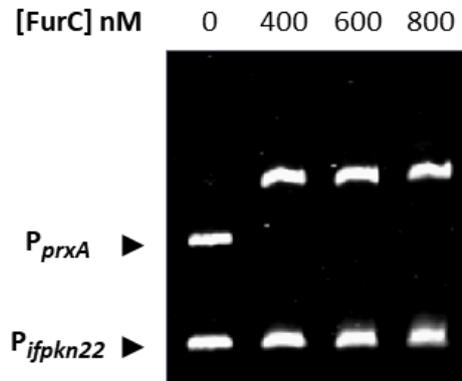


Figura S-3. Ensayo de retardo en gel de FurC con la región promotoras del gen *prxA*. El carril 1 corresponde al control negativo (sin proteína) y los carriles 2, 3 y 4 corresponden al promotor incubado con 400, 600 y 800 nM de FurC, respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6%.

8.8. Sobreexpresión y purificación de FurA

Para sobreexpresar la proteína FurA en *E.coli* se transformaron células competentes de *E.coli* BL21 con el plásmido pET-28a/*furA* y se llevó a cabo un ensayo de sobreexpresión. Su resultado se recoge en la figura S-4 en el que, como se puede observar, la colonia con mayor sobreexpresión fue la 4, de modo que fue la que se seleccionó para llevar a cabo la producción de biomasa y la purificación de la proteína.

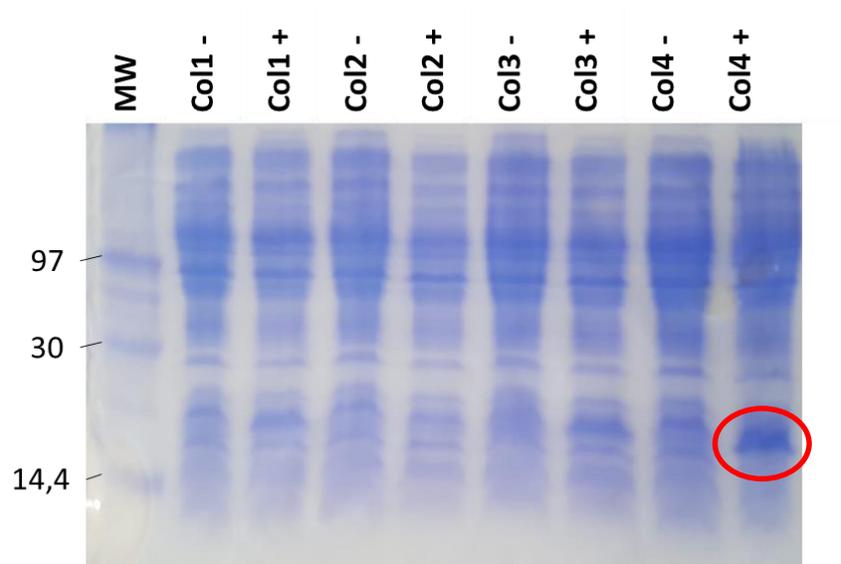


Figura S-4. Resultado del ensayo de sobreexpresión de la proteína FurA en *E.coli* BL21, visualizado mediante una electroforesis desnaturante en gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (Low Molecular Weight Calibration kit, GE Healthcare), algunas de cuyas bandas aparecen señaladas, indicando su peso en kDa y el resto de carriles contienen los extractos celulares de cada cultivo sin inducir (-) e inducidos con 1 mM de IPTG (+). La banda correspondiente a la proteína de interés en la colonia seleccionada aparece rodeada en rojo.

La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a un ión metálico (IMAC) y se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna para determinar en cuales se encontraba la proteína de interés (figura S-5). En este caso las fracciones seleccionadas fueron las fracciones 10-15, que se combinaron y se dializaron.

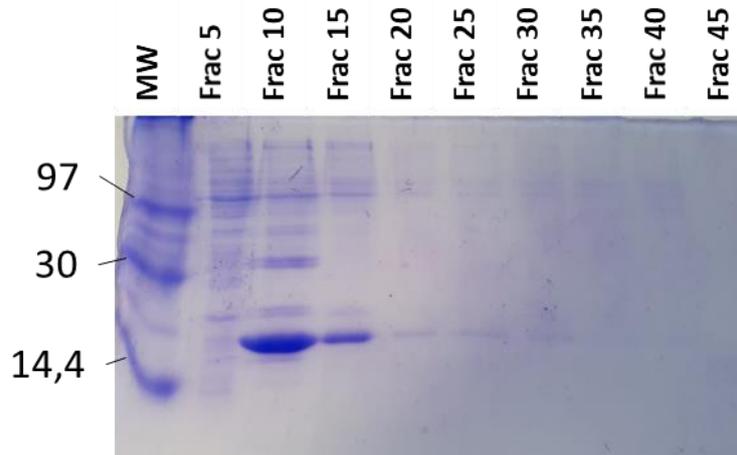


Figura S-5. Fracciones eluidas de la columna de purificación para la proteína FurA, visualizadas mediante una electroforesis desnaturalizante en gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (Low Molecular Weight Calibration kit, GE Healthcare), algunas de cuyas bandas aparecen señaladas, indicando su peso en kDa y el resto de carriles contienen las diferentes fracciones de la purificación.

Tras la diálisis se llevó a cabo una cuantificación de la proteína, obteniendo un valor de 36 μM y se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel con la región promotora de *ntcA* (figura S-6) que permitió determinar que la proteína estaba activa.

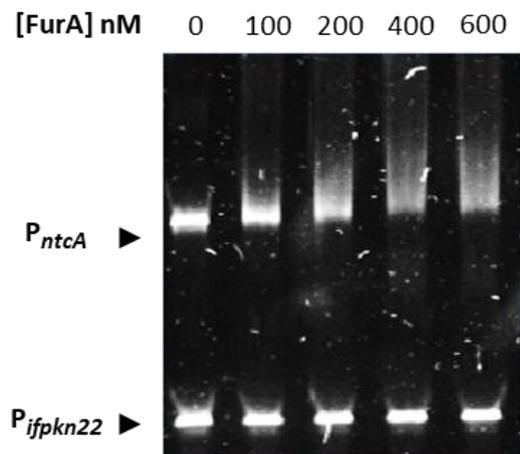


Figura S-6. Ensayo de retardo en gel de FurA con la región promotoras del gen *ntcA*. El carril 1 corresponde al control negativo (sin proteína) y los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden al promotor incubado con 100, 200, 400 y 600 nM de FurA, respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de DNA inespecífico (*ifpkn22*) y con 0,1 mM de Mn^{2+} y 1 mM de DTT. Los fragmentos de DNA libres o incubados con distintas concentraciones de FurC se separaron mediante geles de poliacrilamida al 6%.

ANEXO II: Publicaciones y comunicaciones a congresos

Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster han dado lugar a la siguiente publicación:

- Guío J, Sarasa-Buisán C, Velázquez-Campoy A, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML, Sevilla E. 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. FEBS Letters (Aceptado y pendiente de revisión)

Además han sido presentados en los siguientes congresos

- 2-oxoglutarate enhances FurA binding activity to *ntcA* promoter region in *Anabaena* PCC 7120. Jorge Guío, Cristina Sarasa, Adrián Velázquez-Campoy, M. Teresa Bes, María F. Fillat, María Luisa Peleato and Emma Sevilla IX NATIONAL CONFERENCE BIFI 2019. Zaragoza, febrero de 2019. Comunicación oral y libro de actas
- Global impact of FurC overexpression in *Anabaena* PCC7120 under nitrogen deficiency. Cristina Sarasa, Emma Sevilla, Jorge Guío María Luisa Peleato and María F. Fillat. IX NATIONAL CONFERENCE BIFI 2019. Zaragoza, febrero de 2019. Póster y libro de actas.
- Fur proteins as putative sensors of carbon/nitrogen balance in cyanobacteria: 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. Jorge Guío, Cristina Sarasa, Adrián Velázquez-Campoy, María Teresa Bes, María Luisa Peleato, María F. Fillat and Emma Sevilla. XII Congreso Anual de Biotecnología. Madrid, julio de 2019 (Enviado)

2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120

Journal:	<i>FEBS Letters</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Articles
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sevilla, Emma; University of Zaragoza, Biochemistry and Molecular and Cell Biology Guío, Jorge; University of Zaragoza, Biochemistry and Molecular and Cell Biology Sarasa, Cristina; University of Zaragoza, Biochemistry and Molecular and Cell Biology Velazquez-Campoy, Adrian; University of Zaragoza, Inst. of Biocomputation and Physics of Complex Systems Bes Fustero, Maria Teresa; University of Zaragoza, Dept. of Biochemistry Fillat, Maria F.; Universidad de Zaragoza, Biochemistry and Molecular Cell Biology Peleato Sánchez, Maria Luisa; University of Zaragoza, Dept. of Biochemistry, Fac. of Sciences
Keywords:	
Abstract:	2-oxoglutarate is a central metabolite that acts as a signaling molecule informing about the status of carbon/nitrogen balance of the cell. In the last years, some transcriptional regulators and even two-component systems have been described as 2-oxoglutarate sensors. In the nitrogen-fixing cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 two master regulators, NtcA and FurA, are deeply involved in the regulation of nitrogen metabolism. Both of them show a complex intertwined regulatory circuit to achieve a suitable regulation of nitrogen fixation. In this work, 2-oxoglutarate has been found to bind FurA modulating the specific binding of FurA to the <i>ntcA</i> promoter. This study provides evidences of a new additional control point on the complex network controlled by NtcA and FurA proteins.



Jorge Guio Martinez <jguiomartinez@gmail.com>

FEBS Letters - Decision on Manuscript ID FEBSL-19-0421 [email ref: DL-SW-3-a]

1 mensaje

Miguel De la Rosa <onbehalf@manuscriptcentral.com>

16 de mayo de 2019, 16:14

Responder a: marosa@us.es

Para: esevilla@unizar.es, jguiomartinez@gmail.com, Crisara@unizar.es, adrianvc@unizar.es, tbes@unizar.es, fillat@unizar.es, mpeleato@unizar.es

16-May-2019 - <https://mc.manuscriptcentral.com/febsl>

Dear Dr. Sevilla,

Thank you very much for submitting your manuscript to FEBS Letters. We have now received comments from the referees regarding your manuscript which are given below. As you can see, the referees felt the manuscript was interesting; however, they raised several points of criticism. We would like to give you the opportunity to address the referees' comments by submitting a revised version of the manuscript within the next 30 days. However, to avoid any misunderstanding, I should mention that this invitation to submit a revised manuscript should not be taken as any commitment to accept the revised text; a decision will be made only after further review.

There are two ways to submit your revised manuscript. You may use the link below to submit your revision online with no need to enter log in details:

*** PLEASE NOTE: This is a two-step process. After clicking on the link, you will be directed to a webpage to confirm. ***

https://mc.manuscriptcentral.com/febsl?URL_MASK=a4d608c0171a4aa0bf493b55fbe31dc0

Alternatively log into <https://mc.manuscriptcentral.com/febsl> and enter your Author Center. You can use the revision link or you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision. Please DO NOT upload your revised manuscripts as a new submission.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to FEBS Letters, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision in a reasonable amount of time, we may have to consider your paper as a new submission. If you feel that you will be unable to submit your revision within the time allowed please contact me to discuss the possibility of extending the revision time.

Once again, thank you for submitting your manuscript to FEBS Letters and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,

Prof. Miguel De la Rosa
Editor, FEBS Letters

2-Oxoglutarate Enhances FurA Binding Activity to NtcA Promoter Region in *Anabaena* PCC 7120

Jorge Guío^{1,2}, Cristina Sarasa^{1,2}, Adrián Velázquez-Campoy^{1,2,3,4}, María F. Fillat^{1,2},
María Teresa Bes^{1,2}, Marisa Peleato^{1,2} and Emma Sevilla^{1,2}.

¹ *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain.*

² *Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Spain.*

³ *Aragon Institute for Health Research (IIS Aragon), Biomedical Research Networking Centre for Liver and Digestive Diseases (CIBERehd), Spain.*

⁴ *Fundación ARAID, Government of Aragon, Spain.*

2-oxoglutarate (2-OG), a metabolite produced in the Krebs cycle, plays an important role as a signaling molecule in several organisms. In cyanobacteria, 2-OG acts as a signal of nitrogen starvation and previous studies showed that in nitrogen-fixing *Anabaena* PCC7120 this metabolite enhanced the DNA-binding activity of NtcA, a key regulator for nitrogen metabolism, to its target promoters. Previously, the ferric uptake regulator FurA was reported to modulate the expression of NtcA, connecting iron homeostasis with nitrogen metabolism. In the present work the possible interaction between 2-OG molecule and FurA protein has been evaluated. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) showed that FurA binding activity to *ntcA* gene promoter increased in presence of 2-OG, proving that this metabolite was able to modulate both FurA and NtcA DNA-binding activity. As it has not been possible to crystalize FurA, in order to determine how FurA was able to recognize 2-OG, a model of its tridimensional structure was built and docked with 2-OG. The resulting structure showed that FurA contained a potential binding site for 2-OG and that it was similar to that of NtcA, suggesting that 2-OG was able to bind to FurA, a fact that was proved by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) assays.

Keywords

2-OG/FurA complex | *Anabaena* PCC7120 | EMSA assay | ITC

Global Impact of FurC Overexpression in *Anabaena* PCC7120 under Nitrogen Deficiency

Cristina Sarasa¹, Emma Sevilla¹, Jorge Guío¹, María Luisa Peleato^{1,2}, María F. Fillat^{1,2}

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain.*

²*Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, Spain.*

Among the Fur family proteins in *Anabaena* PCC7120, FurC is the most divergent protein and the most unknown member of the Fur paralogues. It has been proposed to work as the Peroxide stress Regulator (PerR) from *Anabaena* but also FurC has been related to nitrogen metabolism, since the global regulator of this process, NtcA, is able to bind to the FurC promoter. With the aim of clarify the cellular processes in which FurC is involved in *Anabaena*, a strain overexpressing FurC (EB2770FurC) was constructed. RNAseq analyses were performed comparing the transcriptomes of EB2770FurC and *Anabaena* PCC7120 strains grown in the presence of NO₃⁻ (BG11) and the absence of combined nitrogen (BG110). In addition, preliminary bioinformatic analyses were performed in order to find a putative FurC box in the different selected promoters. The results indicated that FurC/PerR not only works as PerR, but it also influenced the expression of different genes among several functional categories indicating a more global role of FurC in *Anabaena*. In addition, this work unveils the influence of FurC expression on the transcriptional pattern under nitrogen deficiency compared to cells grown in BG11, a fact that highlights the key role of FurC in response to nitrogen deficiency.

Keywords

Anabaena PCC7120 | Fur Proteins | Nitrogen Metabolism | RNAseq Analysis | Bioinformatics

