



Esencialidad de la tiorredoxina TrxA en cianobacterias. Estudio de un mutante condicional en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Bioquímica por el Licenciado

MALLEN
PONCE,
MANUEL
JESUS (FIRMA)

Firmado digitalmente por MALLEN PONCE, MANUEL JESUS (FIRMA)
Fecha: 2020.04.20 11:12:56 +02'00'

Manuel Jesús Mallén Ponce

Sevilla, abril de 2020

FLORENCIO
BELLIDO
FRANCISCO
JAVIER -
28455661S

Digitally signed by FLORENCIO BELLIDO FRANCISCO JAVIER - 28455661S
DN: c=ES, serialNumber=IDCES-28455661S, givenName=FRANCISCO JAVIER, sn=FLORENCIO BELLIDO, cn=FLORENCIO BELLIDO FRANCISCO JAVIER - 28455661S
Date: 2020.04.20 13:04:28 +02'00'

Dr. Francisco Javier Florencio Bellido

Catedrático
de Bioquímica y Biología Molecular

Directores:

HUERTAS
ROMERA
MARIA
JOSEFA -
26480277D

Firmado digitalmente por HUERTAS ROMERA MARIA JOSEFA - 26480277D
Fecha: 2020.04.20 11:17:05 +02'00'

Dra. María José Huertas Romera

Profesora Titular
de Bioquímica y Biología Molecular

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC) gracias a un contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación del V Plan Propio de la Universidad de Sevilla. La investigación ha sido financiada a través de diferentes proyectos concedidos al grupo por parte del Ministerio de Economía y Competitividad y de la Junta de Andalucía.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, F. Javier Florencio y M. José Huertas, por haber permitido adentrarme en el mundo de la investigación y por la confianza depositada durante estos años.

Agradecer también a todos mis compañeros del laboratorio 2-3, tanto presentes, Migue, Raquel, Luís, Pablo, Sandra y Maribel, como pasados, Anita, Joaquín, Luisito, Ernesto, Maialen y Rocío entre otros, por los grandes momentos vividos y por compartir conmigo cada paso que he dado con nuestro fantástico “bicho”, como si de una auténtica aventura se tratase. Han sido unos años fabulosos e irrepetibles con todos vosotros incluido por supuesto los directores, donde he participado y disfrutado de “mil y una” discusiones sobre temas que años atrás me fascinaban como el metabolismo o la fotosíntesis. También quiero agradecer a todos aquellos compañeros del IBVF que han hecho más ameno mis días en este centro.

Por supuesto, quiero dar las gracias a mis padres por su paciencia y por su apoyo durante todos los años de formación académica, por ayudarme a tomar decisiones y avanzar. Gracias por estar siempre ahí.

Por último, el mayor agradecimiento es para la persona que ha estado cada día en esta etapa de mi vida, apoyándome de manera incondicional, muchas gracias María José. A pesar de desconocer lo difícil que podía ser esta carrera científica, gracias por apoyarme en todos y cada uno de los momentos, por darme la energía necesaria y por tener una paciencia infinita, gracias por ser como eres.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

ÍNDICE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

ÍNDICE	11
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	14
ABREVIATURAS	15
I. INTRODUCCIÓN.....	17
1. Las cianobacterias.....	19
1.1 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	20
2. La fotosíntesis en cianobacterias.....	21
2.1 Los ficobilisomas: complejos captadores de luz.....	22
2.2 Transporte lineal de electrones (LET).....	24
2.3 Transporte cíclico de electrones y rutas auxiliares.....	25
2.4 Mecanismos de distribución y disipación de la energía.....	27
2.4.1. <i>Non-Photochemical Quenching</i> : OCP y Hlips	27
2.5 Fijación de CO ₂ en cianobacterias.....	29
3. Metabolismo del carbono en cianobacterias	30
4. Sistemas redox en cianobacterias	32
4.1 Producción de especies reactivas de oxígeno	33
4.2 Modificaciones redox de los grupos tiol	34
4.3 Regulación redox en cianobacterias.....	35
4.3.1. Las tiorredoxinas.....	36
4.3.2. Las glutarredoxinas.....	44
II. OBJETIVOS DE LA TESIS	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. Organismos y condiciones de cultivo.....	53
1.1 Cianobacterias	53
1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas	53
1.1.2. Medios y condiciones de cultivo	53
1.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	55
1.2.1. Estirpe de <i>E. coli</i> utilizada	55
1.2.2. Medios y condiciones de cultivo	55
1.3 Métodos de recogida de células.....	56
2. Métodos de Biología Molecular	56
2.1 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	56
2.1.1. Oligonucleótidos.....	56
2.1.2. Plásmidos.....	57
2.2 Aislamiento y manipulación de ADN.....	58
2.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	58
2.2.2. Aislamiento de ADN genómico de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	59
2.3 Introducción de ADN exógeno en organismos.....	59
2.3.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	59
2.3.2. Transformación de células de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	60
2.4 Análisis y cuantificación del ADN	60
2.4.1. Determinación de la concentración de ADN.....	60
2.4.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	61
2.4.3. Extracción de ADN de geles de agarosa	61
2.4.4. Manipulación enzimática de ADN	61



2.4.5.	Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	61
2.4.6.	PCR solapante.....	62
2.4.7.	Secuenciación de ADN	62
2.5	Análisis y cuantificación del ARN	62
2.5.1.	Tratamiento del material.....	62
2.5.2.	Aislamiento de ARN total.....	63
2.5.3.	Cuantificación de ARN aislado	63
2.5.4.	Electroforesis de ARN	63
2.5.5.	Detección del ARNm mediante hibridación ARN-ADN (Northern blot).....	64
2.5.6.	Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq).....	64
3.	Métodos de Bioquímica	65
3.1	Preparación de extractos celulares	65
3.1.1.	Rotura con perlas de vidrio.....	65
3.1.2.	Rotura por ultrasonidos	65
3.1.3.	Rotura con ácido tricloroacético (TCA)	65
3.2	Cuantificación de proteínas.....	66
3.3	Electroforesis de proteínas.....	66
3.3.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	66
3.3.2.	Electroforesis en condiciones nativas (Blue Native)	67
3.4	Tinción de proteínas	68
3.4.1.	Tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB)	68
3.5	Inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot).....	68
3.6	Alquilación de proteínas.....	69
3.7	Determinación de nucleótidos de adenina.....	71
3.8	Determinación de aminoácidos	71
3.9	Marcaje de proteínas <i>in vivo</i> con ³⁵ S-Met/Cys	71
4.	Métodos de Biofísica.....	72
4.1	Fluorescencia de la clorofila <i>a</i> : Actividad del PSII.....	72
4.1.1.	Curva de inducción-recuperación	72
4.1.2.	Fluorescencia post-iluminatoria	73
4.1.3.	Estados de transición	74
4.2	Absorbancia de P700: Actividad del PSI.....	74
4.2.1.	Determinación de la cantidad máxima fotooxidable del PSI (Pm).....	74
4.2.2.	Tasas de transporte de electrones.....	75
4.3	Análisis del gradiente de protones (Δ pH).....	75
4.4	Medida de la fluorescencia del NAD(P)H.....	76
4.5	Evolución de oxígeno mediante electrodo de Clark	76
4.6	Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	76
4.7	Citometría de flujo.....	77
4.7.1.	Conteo de células	77
4.7.2.	Análisis del tamaño y complejidad celular.....	77
4.8	Microscopía	77
4.8.1.	Microscopía de campo claro y fluorescencia.....	77
4.8.2.	Microscopía de fluorescencia confocal	77
4.8.3.	Microscopía electrónica.....	78
5.	Métodos de Proteómica	78
5.1	Identificación de proteínas	78
6.	Ensayos enzimáticos	78
6.1	Determinación enzimática de la fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	78
6.2	Determinación enzimática de glucógeno	79
6.3	Determinación enzimática de la cianoficina	79
7.	Métodos bioinformáticos	80
7.1	Análisis transcriptómico	80
7.2	Análisis filogenéticos.....	80



8. Otros métodos analíticos.....	81
8.1 Determinación de la concentración de la clorofila	81
8.2 Determinación de la concentración de ficobiliproteínas.....	81
8.3 Determinación de la concentración de carotenoides.....	81
8.4 Medidas espectrofotométricas.....	82
8.5 Medidas del pH.....	82
IV. RESULTADOS.....	83
1. STXA2, un mutante con bajos niveles de TrxA.....	85
1.1 Generación del mutante STXA2.....	85
1.2 Relación entre crecimiento y niveles de TrxA	87
1.3 Caracterización del crecimiento de STXA2 en condiciones estándar	90
1.4 Caracterización fenotípica de STXA2 con niveles alterados de TrxA	93
1.5 Análisis de estirpes revertientes espontáneas	94
1.6 Crecimiento de STXA2 en diferentes condiciones de cultivo.....	95
2. Efecto del déficit de TrxA sobre las cadenas de transporte de electrones	97
2.1 Cambios en el estado <i>redox</i> del <i>pool</i> de plastoquinona y actividad del PSII.....	97
2.2 Efectos sobre el fotosistema I	108
2.3 Medidas del <i>pool</i> de NADPH en STXA2 con distintos niveles de TrxA	113
2.4 La cantidad de TrxA en la estirpe STXA2 afecta a los niveles intracelulares de ATP	115
2.5 La estirpe STXA2 presenta una alteración de los complejos tilacoidales y una disminución de las enzimas del CBB	118
2.6 Análisis del estado <i>redox</i> de las tioredoxinas y de las enzimas SBP/FBPasa y FBPasa en la estirpe STXA2.....	121
3. Respuesta del mutante STXA2 a estrés lumínico y oxidativo.....	129
3.1 Respuesta a estrés oxidativo y niveles de ROS en el mutante STXA2.....	129
3.2 Sensibilidad a altas intensidades lumínicas del mutante STXA2.....	133
3.3 La estirpe STXA2 presenta cambios en los mecanismos de fotoprotección	135
4. TrxA afecta a distintos procesos celulares metabólicos y morfológicos.....	138
4.1 Cambios morfológicos asociados a una limitación en el crecimiento.....	138
4.2 Acumulación de polímeros de reserva, cianoficina y glucógeno.....	142
4.3 Limitación de la traducción de proteínas en STXA2.....	144
5. La adición de inductor permite la recuperación de la estirpe STXA2.....	151
6. Respuesta transcripcional a la disminución en los niveles de TrxA.....	160
6.1 TrxA es esencial para mantener el régimen transcripcional diurno.....	160
6.1.1. Transporte de electrones.....	163
6.1.2. Metabolismo del carbono	165
6.1.3. Replicación, transcripción y traducción	167
6.2 Sistemas de regulación <i>redox</i> y estrés oxidativo	168
6.3 Factores transcripcionales y sistema de dos componentes.....	169
6.3.1. Análisis de la regulación transcripcional de FurA en la estirpe STXA2	169
6.3.2. Análisis de la regulación transcripcional de PedR en la estirpe STXA2.....	174
6.3.3. Análisis de factores transcripcionales de tipo OmpR en la estirpe STXA2.....	176
6.3.4. Análisis de la regulación transcripcional de RbcR en la estirpe STXA2	178
V. DISCUSIÓN	181
1. Función esencial de TrxA en el mantenimiento de la fotosíntesis y en el ciclo de CBB	184
2. Papel de TrxA en la regulación <i>redox</i> de la 2-Cys Prx y en la defensa a estrés oxidativo.....	190



ÍNDICE

3. Posible control <i>redox</i> en la traducción de proteínas y estado de dormancia	191
4. Posible control <i>redox</i> de TrxA sobre factores transcripcionales	195
VI. CONCLUSIONES	203
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	207

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena de transporte de electrones en las membranas de *Synechocystis*.....21

Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los PBS unidos al PSII.....23

Figura 3. Mecanismos de protección del aparato fotosintético en cianobacterias.....28

Figura 4. Ciclo de Calvin-Benson en cianobacterias.....30

Figura 5. Diferentes rutas glucolíticas en cianobacterias.....31

Figura 6. Producción de especies reactivas de oxígeno en las membranas tilacoidales de las cianobacterias.....34

Figura 7. Mecanismos de oxidación por ROS de los grupos sulfhidrilos de las cisteínas de las proteínas.....35

Figura 8. Sistemas de reducción de las tiorredoxinas en las cianobacterias.....37

Figura 9. Procesos celulares regulados por las TRX basado en los estudios proteómicos realizados en *Synechocystis* y *Anabaena*.....41

Figura 10. Mecanismos de acción de las glutarredoxinas en las cianobacterias.....45

Figura 11. Fluorescencia de la clorofila *a*.....72

Figura 12. Construcción de estirpes mutantes con distintos niveles de TrxA.....86

Figura 13. Caracterización de la estirpe STXA2 y niveles de TrxA en diferentes concentraciones de arsenito.....88

Figura 14. Niveles de clorofila y ficobiliproteínas de la estirpe STXA2 en diferentes concentraciones de arsenito.....89

Figura 15. Curva de crecimiento y niveles de TrxA en la estirpe STXA2 tras la retirada de arsenito del medio.....91

Figura 16. Análisis del sistema FTR/TRX y de dos GRX en la estirpe STXA2.....92

Figura 17. Efecto de la disminución de TrxA en el contenido de clorofila, ficobiliproteínas y carotenoides.....93

Figura 18. Aparición de estirpes mutantes revertientes.....94

Figura 19. Análisis de las estirpes revertientes STXA2R.....95

Figura 20. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en distintas condiciones de crecimiento.....96

Figura 21. Curvas de inducción-recuperación en STXA2 con distintos niveles de TrxA.....100

Figura 22. Respuesta NPQ dependiente del estado del *pool* de PQ.....101

Figura 23. Niveles relativos de centros de reacción abiertos (F_q) y rendimiento del PSII (YII) en luz en STXA2.....102

Figura 24. Niveles relativos de fluorescencia variable (F_v) y F_v/F_m en oscuridad en STXA2...103

Figura 25. Medida del incremento de la fluorescencia tras finalizar la iluminación en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....105

Figura 26. Medida de los estados de transición en STXA2 con distintos niveles de TrxA.....106

Figura 27. Evolución de oxígeno en las estirpes WT y STXA2.....107

Figura 28. Cinética rápida de pulso corto de P700 en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....109

Figura 29. Cantidad máxima fotooxidable de P700 en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....110

Figura 30. Transporte de electrones fotosintético en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....111

Figura 31. Cinética de oxidación-reducción de P700 en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....112

Figura 32. Cinética de fluorescencia de NAD(P)H en STXA2 con distintos niveles de TrxA...114

Figura 33. Cinética de formación de Δ pH a través de las membranas tilacoidales en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....116

Figura 34. Medida de los niveles de ATP, ADP y AMP en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....117



Figura 35. Carga energética celular y niveles totales de nucleótidos de adenina en WT y STXA2.....	118
Figura 36. Análisis mediante Western blot de proteínas de la membrana tilacoidal y del ciclo de CBB en la estirpe STXA2.....	120
Figura 37. Análisis de los complejos tilacoidales mediante Blue-Native en las estirpes WT y STXA2.....	121
Figura 38. Estado <i>redox in vivo</i> de las tiorredoxinas TrxA, TrxB y TrxQ en <i>Synechocystis</i>	123
Figura 39. Estado <i>redox in vivo</i> de TrxA en la estirpe STXA2 con arsenito.....	124
Figura 40. Estado <i>redox in vivo</i> de TrxB y cambios en la respuesta a luz en la estirpe STXA2.....	125
Figura 41. Estado <i>redox in vivo</i> de la SBP/FBPasa y FBPasa en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....	127
Figura 42. Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa <i>in situ</i> en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....	128
Figura 43. Estado <i>redox in vivo</i> de la 2-Cys Prx en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....	129
Figura 44. Contenido en ROS de las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....	130
Figura 45. Contenido en ROS tras la inducción con metil viológeno en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA.....	131
Figura 46. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	132
Figura 47. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en diferentes intensidades lumínicas.....	134
Figura 48. Evolución en la concentración de clorofila de la estirpe STXA2 en las diferentes intensidades lumínicas.....	135
Figura 49. Curvas de inducción-recuperación en condiciones de alta intensidad lumínica.....	136
Figura 50. Respuesta a alta luz dependiente de OCP.....	137
Figura 51. Análisis mediante microscopía óptica y de fluorescencia de la estirpe STXA2.....	138
Figura 52. Cambios morfológicos en la estirpe STXA2 dependiente de los niveles de TrxA.....	139
Figura 53. Distribución de los complejos captadores de luz.....	140
Figura 54. Ultraestructura de las estirpes WT y STXA2 mediante microscopía electrónica.....	141
Figura 55. Niveles de glucógeno de las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor.....	142
Figura 56. Niveles de cianoficina en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor.....	143
Figura 57. Cuantificación de la cantidad total de proteínas solubles en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de arsenito.....	145
Figura 58. Tasa de traducción a proteínas en WT y STXA2 en presencia de inductor.....	145
Figura 59. Evolución de la tasa de traducción de proteínas en WT y STXA2 tras la retirada de arsenito del medio.....	147
Figura 60. Cuantificación de aminoácidos libres totales en las estirpes WT y STXA2.....	148
Figura 61. Cambios en los aminoácidos libres identificados en las estirpes WT y STXA2.....	149
Figura 62. Efecto de la adición de arsenito en la estirpe STXA2 después de 48 horas y acumulación de TrxA.....	151
Figura 63. Medida del contenido de clorofila y ficobiliproteínas en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor.....	152
Figura 64. Determinación de los niveles de glucógeno y cianoficina de la estirpe STXA2 tras la adición de inductor.....	153
Figura 65. Ultraestructura la estirpe STXA2 tras la adición de inductor mediante microscopía electrónica.....	153
Figura 66. Evolución de oxígeno de la estirpe STXA2 tras la adición del inductor.....	154
Figura 67. Medida de los niveles energéticos en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor.....	155
Figura 68. Evolución de la tasa de traducción de proteínas en STXA2 tras la adición del inductor.....	156



Figura 69. Cuantificación de aminoácidos libres totales en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor.....	157
Figura 70. Cuantificación de los aminoácidos en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor.	158
Figura 71. Respuestas globales a cambios en los niveles de TrxA.	161
Figura 72. Cambios en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo energético de <i>Synechocystis</i>	164
Figura 73. Cambios en la expresión de los genes relacionados con el ciclo de CBB y el carboxisoma en <i>Synechocystis</i>	166
Figura 74. Cambios en la expresión de los genes relacionados con los sistemas <i>redox</i> en la estirpe STXA2.....	169
Figura 75. Cambios en la expresión de los genes del regulón de FurA en la estirpe STXA2. .	170
Figura 76. Análisis mediante Western blot de los niveles y del estado <i>redox</i> in vivo de FurA en las estirpes WT y STXA2.....	173
Figura 77. Cambios en la expresión de los genes del regulón de PedR en la estirpe STXA2.	175
Figura 78. Árbol filogenético de las tiorredoxinas identificadas en cianobacterias secuenciadas.....	183
Figura 79. Enzimas del ciclo de CBB con regulación <i>redox</i>	189
Figura 80. Cambios en el transporte de electrones y en el aparato fotosintético en la estirpe STXA2.	190
Figura 81. Análisis de las estirpes SNTRC y STXA2C.	195
Figura 82. Comparativa del RNA-seq de este trabajo con los cambios en la expresión en los ciclos luz-oscuridad de Saha et al., 2016.....	198
Figura 83. Modelo propuesto de regulación <i>redox</i> de PedR a través de TrxA.	199



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.....53
Tabla 2. Composición del medio de cultivo BG11C.....54
Tabla 3. Antibióticos utilizados en las estirpes de *Synechocystis*54
Tabla 4. Estirpe de *E. coli* utilizada en este trabajo.....55
Tabla 5. Composición del medio de cultivo LB.....55
Tabla 6. Antibióticos utilizados en las estirpes de *E. coli*.....56
Tabla 8. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.....57
Tabla 9. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.....58
Tabla 10. Composición del gel de acrilamida en gradiente.....68
Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.....69
Tabla 12. Tasas de crecimiento en diferentes concentraciones de inductor.....88
Tabla 13. Parámetros fotosintéticos determinados mediante PAM-100.....97



ABREVIATURAS

Δ pH	Gradiente de protones
•OH	Radical hidróxilo
1,3BPG	1,3-bisfosfoglicerato
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
3PG	3-fosfoglicerato
AMS	Ácido 4-acetamido-4'-maleimidilestilbeno-2,2'-disulfónico
APC	Alofococianina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
AY	Amarillo de acridina
CBB	Ciclo de Calvin-Benson-Bassham
CET	Transporte cíclico de electrones
Cit <i>b₆f</i>	Citocromo <i>b₆f</i>
Cit <i>c₆</i>	Citocromo <i>c₆</i>
CM-H ₂ DCFDA	2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, acetil ester
COX	Citocromo c oxidasa
Cyd	Quinol oxidasa <i>bd</i>
DCMU	3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilurea
DDOR	Disulfuro oxidoreductasa ligado a dos flavinas
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTR	Tiorredoxina reductasa <i>deeply rooted</i>
E4P	Eritrosa-4-fosfato
F1,6BP	Fructosa 1,6-bisfosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fdx	Flavodoxina
FLV	Flavoproteínas de hierro o <i>Flavodiiron</i>
FNR	Ferredoxina:NADP+ reductasa
FRP	Proteína de recuperación de la fluorescencia
FT	Factores transcripcionales
FTR	Ferredoxina-tiorredoxina reductasa
FTRC	Subunidad catalítica de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa
FTRV	Subunidad variable de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa
GA	Glicolaldehído
GAP	Gliceraldehído 3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GR	Glutación reductasa
GRX	Glutarredoxinas
GSH	Glutación
GSI	Glutamina sintetasa de tipo I
GST	Glutación S-transferasas
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HLIP	Proteína inducidas por alta luz
L _C	Enlace núcleo
LET	Transporte lineal de electrones
L _R	Enlace varilla
L _{RC}	Enlace varilla-núcleo
min	Minutos
MM(PEG ₂₄)	Metil-PEG-Maleimida
ms	Milisegundo
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NDH-1	NAD(P)H deshidrogenasa tipo I
NDH-2	NAD(P)H deshidrogenasa tipo II
NEM	N-etilmaleimida
NPQ	Extinción no fotoquímica o <i>Non-Photochemical Quenching</i>
NTR	NAD(P)H tiorredoxina reductasa



NTRC	Tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH tipo C
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OCP	Proteína carotenoides naranja
OPP	Ruta de las pentosas fosfato
PRK	Fosforibuloquinasa
PBP	Ficobiliproteínas
PBS	Ficobilisomas
PC	Plastocianina
PCN	Ficocianina
PDI	Disulfuro isomerasas
PE	Ficoeritrina
PQ	Plastoquinonina
PRX	Peroxirredoxinas
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
R5P	Ribosa-5-fosfato
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RSS	Especies reactivas de azufre
Ru1,5BP	Ribulosa-1,5-bisfosfato
Ru5P	Ribulosa-5-fosfato
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa
s	Segundos
S1,7BP	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SBP/FBPasa	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa/fructosa-1,6-bisfosfatasa
SDH	Succinato deshidrogenasa
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TR	Tiorredoxina reductasa
TRX	Tiorredoxina
Xu5P	Xilulosa-5-fosfato



I. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

1. Las cianobacterias

Las cianobacterias representan el grupo más amplio y diverso de los procariotas fotosintéticos. Se diferencian del resto de bacterias fotosintéticas en los pigmentos (presencia de clorofila y ficobilinas) y por su capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Las cianobacterias son los autótrofos ancestrales de los cloroplastos (Cavalier-Smith, 2000, 2010; Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005; Yagi y Shiina, 2014). En el evento primario de la endosimbiosis se produjo la incorporación de una cianobacteria ancestral en una célula eucariota primitiva hace 1500 millones de años aproximadamente (Hedges et al., 2004; Soo et al., 2017; Yoon et al., 2004). Esto dio lugar a tres linajes principales de cloroplastos en glaucocitas, clorofitas (algas verdes y plantas) y rodofitas (algas rojas). Las cianobacterias presentan una amplia plasticidad ecológica, habitan desde los glaciares del Ártico hasta el desierto del Sahara (Whitton, 2012). A través del registro fósil, se ha demostrado la existencia de colonias microbianas fotosintéticas en fósiles con 2500-3500 millones de años (Alcott et al., 2019; López-García et al., 2006; Schopf, 1993, 2011; Westall, 2006). Estos organismos han desempeñado un papel fundamental en la aparición de la Atmósfera oxidante gracias a la liberación de O₂ como producto de la fotosíntesis. La acumulación de O₂ permitió el desarrollo de la capa de ozono, protegiendo la Tierra de la radiación UV y proporcionando protección a las distintas formas de vida. Estos eventos favorecieron la evolución de formas de vida heterotróficas con capacidad de obtener energía utilizando O₂ como aceptor terminal (Blankenship, 1992).

Las cianobacterias son los principales productores primarios en los océanos, proporcionando un tercio de la producción primaria (Bryant, 2003; Field et al., 1998). Determinadas cianobacterias fijadoras de nitrógeno contribuyen de manera importante al ciclo del nitrógeno en los océanos (Montoya et al., 2004). Otras cianobacterias son endosimbiontes en líquenes, plantas o protistas, y proporcionan carbono y nitrógeno fijado biológicamente al huésped (Foster y Zehr, 2019).

El linaje de las cianobacterias está formado por distintos grupos morfológicos que incluyen cianobacterias unicelulares individuales y formadoras de colonias, así como filamentosas (Knoll, 2008). Además, existen cianobacterias que poseen células vegetativas con predisposición a diferenciarse, como los heterocistos (células fijadoras de N₂), los hormogonios (filamentos móviles multicelulares) o acinetos (células latentes resistentes a estrés) (Flores y Herrero, 2010; Singh y Montgomery, 2011). El metabolismo de las cianobacterias también es muy versátil, con capacidad fotoautotrófica, fotoheterotrófica, mixotrófica y heterotrófica activada por un pulso de luz (Anderson y McIntosh, 1991; Rippka, 1972).



INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias se clasifican como bacterias Gram-negativas debido a la composición y organización de la pared celular. La célula presenta una membrana externa, una capa de peptidoglicano y una membrana plasmática que es selectivamente permeable (Casella et al., 2017; Liberton et al., 2006, 2013; Mareš et al., 2019; Van De Meene et al., 2006). En el interior se encuentra un conjunto de endomembranas denominadas membranas tilacoidales, donde tiene lugar el transporte de electrones fotosintético, acoplado a la producción de ATP y NADPH. Estas membranas tilacoidales están organizadas formando una serie de capas y no en forma de grana como en los cloroplastos de las plantas (Van De Meene et al., 2006; Nevo et al., 2007). Las cianobacterias también presentan otras características especiales, como la presencia de los ficobilisomas (complejos captadores de luz), los carboxisomas icosaédricos (donde ocurre la fijación de CO₂) y diversos gránulos de almacenamiento característicos como la cianoficina (Kerfeld et al., 2010).

Desde 1996 hasta ahora se han secuenciado un gran número de genomas de cianobacterias. El genoma de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue el primer genoma secuenciado de un organismo fotosintético (3.6 Mbp con más de 3000 marcos de lectura abierta) (Kaneko et al., 1996). En general, el contenido en G+C es muy variable entre especies, oscila entre 32 y 71% según la estirpe. La mayoría de especies son organismos poliploides y contienen alrededor de 12 copias cromosómicas por célula (Labarre et al., 1989). Muchas cianobacterias, como por ejemplo las estirpes del género *Synechocystis*, tienen la capacidad de incorporar ADN exógeno en su genoma de forma estable mediante transformación y recombinación homóloga (Porter, 1986). En el caso de cianobacterias no transformables, se han desarrollado otras técnicas como la conjugación (Flores y Wolk, 1985; Wolk et al., 1984) y la electroporación (Thiel y Poo, 1989). Algunas de estas características fisiológicas hacen que ciertas cianobacterias sean organismos modelo adecuados para estudiar la fotosíntesis, la fijación de N₂ o la fijación de CO₂, entre otros procesos. Para este trabajo se ha sido utilizado la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803.

1.1 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 (en adelante *Synechocystis*) es una especie unicelular, no tóxica y no diazotrófica. Se aisló inicialmente de un lago de agua dulce de California (Ikeuchi y Tabata, 2001; Stanier et al., 1971) y se incorporó en la Colección de Cultivos Pasteur (PCC) (Rippka et al., 1979). Es una especie poliploide (Griese et al., 2011) y contiene siete plásmidos (Kaneko et al., 2003). Esta especie tiene un tiempo de duplicación menor respecto a otros organismos fotosintéticos, presenta una gran versatilidad metabólica y es fácilmente transformable por recombinación homóloga.



Además, *Synechocystis* puede cultivarse en diferentes condiciones fisiológicas (fotoautotrófica, mixotrófica y heterotrófica). Todas estas características hacen que esta especie sea un organismo modelo muy utilizado en investigación de procesos como la fotosíntesis y más recientemente por su potencial uso biotecnológico.

2. La fotosíntesis en cianobacterias

La fotosíntesis oxigénica es el proceso que llevan a cabo cianobacterias, algas y plantas para convertir la energía solar en energía química necesaria para el mantenimiento de su actividad metabólica, en especial la fijación de CO₂. Además, el proceso fotosintético permite mantener la concentración de O₂ en la atmósfera y aporta las moléculas orgánicas y la mayor parte de la energía para la vida en la Tierra (Bryant y Frigaard, 2006).

La conversión de energía en los organismos fotosintéticos agrupa las reacciones que utilizan la luz para formar ATP y NADPH, que se utilizarán como fuente de energía en las reacciones de asimilación de carbono para generar los carbohidratos. Las reacciones dependientes de luz se llevan a cabo en las membranas tilacoidales o próximas a estas, y están implicados cuatro grandes complejos proteicos: fotosistema II (PSII), citocromo *b6f* (Cit *b6f*), fotosistema I (PSI) y ATP sintasa (ATPasa) (Figura 1). Además, existen componentes móviles entre los que se incluyen: plastoquinona (PQ), plastocianina (PC), citocromo C₆ (Cit C₆), ferredoxinas (Fd) y ferredoxina:NADP⁺ reductasa (FNR) (Figura 1).

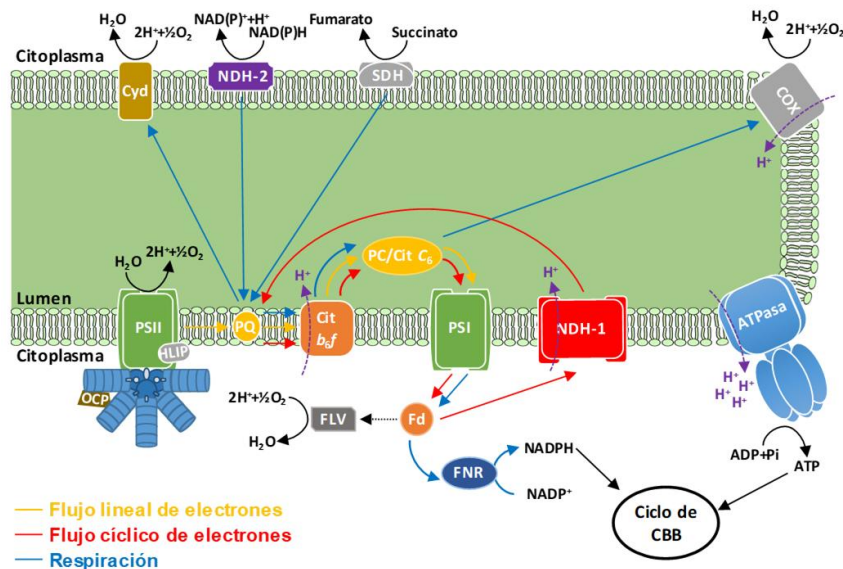


Figura 1. Cadena de transporte de electrones en las membranas de *Synechocystis*. Representación esquemática de los flujos de electrones. PSII, fotosistema II; PQ, *pool* de plastoquinonas; Cit *b6f*, citocromo *b6f*; PC, plastocianina; Cit C₆, citocromo C₆; PSI, fotosistema I;



INTRODUCCIÓN

Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP⁺ reductasa; NDH-1, NAD(P)H deshidrogenasa tipo I; FLV, *flavodiiron*; OCP, proteína carotenoide naranja; HLIP, proteína inducida por alta luz; COX, citocromo oxidasa terminal; Cyd, quinol oxidasa; NDH-2, NAD(P)H deshidrogenasa tipo II; SDH, succinato deshidrogenasa; ATPasa, ATP sintasa.

Los electrones derivados del PSII se transportan hasta el NADP⁺ para generar NADPH mediante el transporte lineal de electrones fotosintético (LET). De manera simultánea, se establece una fuerza protón motriz a través de la membrana tilacoidal que permite la síntesis de ATP. El NADPH y el ATP generados se utilizan como poder reductor y energía para la fijación de CO₂ y la producción de triosas fosfato en el ciclo de Calvin Benson Bassham (CBB) en el citoplasma. Además del LET, las cianobacterias tienen otras rutas auxiliares de transporte de electrones que pueden utilizarse para el suministro de energía (Lea-Smith et al., 2016), como por ejemplo el transporte cíclico de electrones (CET) (Figura 1).

2.1 Los ficobilisomas: complejos captadores de luz

En las cianobacterias, las principales estructuras de captación de la luz se denominan ficobilisomas (PBS), que son complejos proteicos localizados en la superficie de la membrana tilacoidal y que captan de manera eficiente la luz solar para excitar los fotosistemas (Grossman et al., 1993; MacColl, 1998). Los PBS contribuyen a que las cianobacterias absorban la mayor parte de la luz visible junto con la clorofila *a* y los carotenoides, que tienen máximos de absorción de 430-440/670 nm y 420-480 nm respectivamente (Mimuro y Katoh, 1991). Estos complejos están formados por un conjunto de proteínas solubles con un tamaño de hasta 7000 kDa y están situados en la región orientada hacia el citoplasma. Las proteínas solubles que forman parte de los PBS son las ficobiliproteínas, que se encuentran unidas covalentemente a unos cromóforos conocidos como ficobilinas. Las ficobiliproteínas absorben luz solar de longitudes de onda entre 500 y 650 nm y se han descrito distintos tipos como las ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrinas (Glazer, 1984; Stadnichuk et al., 2015). Los PBS presentan una serie de proteínas de enlace sin cromóforos que conectan las ficobiliproteínas entre sí y con los complejos de los fotosistemas. La disposición en forma de varilla, formada por apilamiento de discos, asegura el transporte de energía unidireccional hacia el núcleo del PBS, y posteriormente a los fotosistemas (Figura 2). Entre las distintas cianobacterias existen diferencias en los tipos de ficobiliproteínas y su disposición. En *Synechocystis*, las varillas están compuestas de ficocianina (máximo de absorción a 620 nm) y el núcleo del PBS está compuesto de aloficocianina (máximo de absorción a 650 nm) (Arteni et al., 2009; Kirilovsky, 2015).



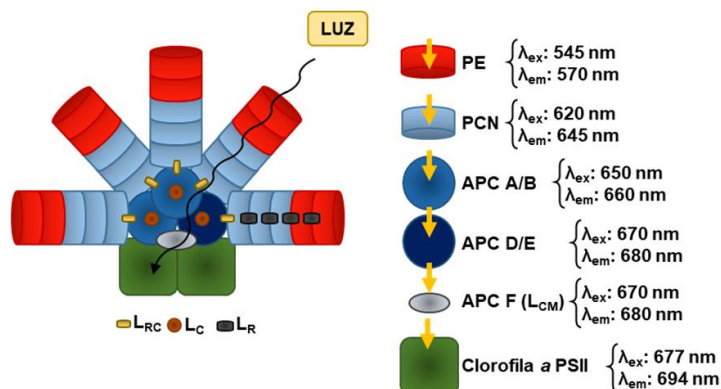


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los PBS unidos al PSII. La excitación y emisión máxima, λ_{ex} y λ_{em} respectivamente, se han obtenido de Kirilovsky, 2015. Clorofila a PSII, clorofila a del fotosistema II; PE, ficoeritrina; PCN, ficocianina; APC A/B/D/E/F, alofococianinas A/B/D/E/F respectivamente; L_{RC}, linker rod-core o enlace varilla-núcleo; L_C, linker core o enlace núcleo y L_R, linker rod o enlace varilla.

En cianobacterias, los PBS parecen realizar un papel importante en las denominadas “transiciones de estado”, proceso de adaptación a la luz que regula la distribución de la energía de excitación entre el PSII y el PSI inducido por cambios en el estado *redox* del *pool* de PQ (Mullineaux y Allen, 1986, 1990, 2004; Papageorgiou y Govindjee, 2014). Cuando los PBS están principalmente acoplados al PSII, recibirá más energía que el PSI, estando en estado I. Cuando la mayoría de los PBS se asocian al PSI, las células estarán en estado II (Kirilovsky, 2015). Así, la energía de excitación recibida por el PSII disminuye y la recibida por PSI aumenta durante la transición del estado I al estado II, mientras que durante la transición del estado II al estado I ocurre lo contrario (Campbell et al., 1998). Además, algunos PBS se desacoplan de manera reversible del PSI o del PSII (Chukhutsina et al., 2015), aunque también se pueden formar complejos funcionales que incluyen los PBS, PSII y PSI (Liu et al., 2013). En la oscuridad, a diferencia de algas y plantas, las cianobacterias se encuentran en estado II debido a la reducción del *pool* de PQ como resultado de la respiración.

Los PBS también tienen un papel importante en la respuesta a los periodos de estrés ambiental y nutricional (Collier et al., 1994; Grossman et al., 1993). La gran cantidad de ficobiliproteínas necesarias para su formación permite que sea una gran reserva de nutrientes. Así, la reutilización de las ficobiliproteínas es crucial para la supervivencia cuando hay una disminución de la fotosíntesis, durante la limitación de nitrógeno, azufre o fósforo. La degradación de los PBS proporciona aminoácidos para mantener las actividades metabólicas centrales además de actuar como una forma de fotoprotección. A medida que el metabolismo celular se ralentiza durante el agotamiento de nutrientes, la energía recibida debe disminuir para evitar la formación de especies reactivas de oxígeno.



INTRODUCCIÓN

La degradación de los PBS es un proceso rápido y específico que implica la formación de varios complejos proteicos (Forchhammer y Schwarz, 2019). Entre las proteínas necesarias para iniciar la actividad de proteasas y liasas en la degradación de los PBS destaca NblA, la cuál actúa como adaptador entre la proteasa Clp y las fibobiliproteínas (Baier et al., 2001). El gen *nblA* se induce en condiciones limitantes de nutrientes o en altas intensidades lumínicas, y presenta un promotor complejo con varios sitios de inicio de la transcripción, sujeto a la regulación por diferentes componentes (Forchhammer y Schwarz, 2019).

2.2 Transporte lineal de electrones (LET)

Como se ha indicado anteriormente, en el LET participan tres complejos de proteínas integradas en la membrana tilacoidal: PSII, Cit *b₆f* y PSI, responsables del transporte de electrones desde H₂O hasta NADP⁺. Estos complejos están conectados por varios tipos de transportadores móviles como el *pool* de PQ, que transporta los electrones entre el PSII y el Cit *b₆f* a través de la membrana tilacoidal. Por otro lado, tanto la PC como el Cit C₆, según la disponibilidad de Cu²⁺, son los responsables del transporte de electrones desde Cit *b₆f* al PSI en el lumen tilacoidal. Finalmente, la Fd acepta electrones en el lado citoplasmático y lo transportan a la FNR que reducirá NADP⁺ a NADPH (Figura 1).

El LET está basado en el clásico esquema en Z (Hill y Bendall, 1960), donde los fotones absorbidos por los PBS excitan las clorofilas de los centros de reacción, P680 (P680*) en PSII y P700 (P700*) en el PSI. El PSII se organiza como un dímero donde ambos monómeros están compuestos por 20 subunidades, entre las que se incluyen las proteínas transmembrana principales D1 y D2, así como las proteínas antena CP43 y CP47 (Shen, 2015). En el rango de picosegundos, P680* reduce una molécula de feofitina que posteriormente cede el electrón a una molécula de plastoquinona Q_A convirtiéndola en semiquinona, que dona su electrón a la plastoquinona Q_B, moléculas liposolubles que se encuentran unidas al centro de reacción. Una vez que Q_B ha aceptado dos electrones y capta dos protones desde el citoplasma, formará plastohidroquinona (PQH₂). Tras ceder el electrón, P680* queda en estado oxidado y oxida a un residuo de tirosina (Tyr_Z) de la subunidad proteica D1. En milisegundos, Tyr_Z retira un electrón a un centro de 4 átomos de manganeso (Mn₄CaO₅) que une dos moléculas de H₂O.

El LET continúa desde PQH₂ hacia el complejo Cit *b₆f*, que es un dímero con 8 subunidades por cada monómero, donde PQH₂ es oxidado y libera dos protones al lumen tilacoidal. El primer electrón aceptado por Cit *b₆f* desde PQH₂ se transporta a través de la proteína Rieske y el citocromo *f* a la PC soluble (o Cit C₆) en el lumen



tilacoidal. Un segundo electrón continúa hasta el ciclo Q. Al reducir dos grupos hemo en el citocromo b_6 , este segundo electrón termina en la PQ en el lado citosólico y se protona a PQH_2 con otro electrón, oxidándose nuevamente por el complejo Cit b_6f y liberando dos protones en el lumen. De esta forma, se transportan dos protones desde el citosol al lumen tilacoidal por cada electrón (Figura 1).

Otro de los complejos proteicos de la membrana tilacoidal es el PSI, compuesto por 12 subunidades. La estructura del PSI se resolvió mediante cristalografía de rayos X en *Synechococcus elongatus* a 2.5 Å (Jordan et al., 2001). Se organiza como un trímero en las cianobacterias aunque en algunas especies puede aparecer como dímero o incluso tetramero (Kato et al., 2019; Li et al., 2014). El principal donador de electrones del PSI son dos moléculas de clorofila llamadas P700, debido a que absorben a longitudes de onda mayores (700 nm), y se encuentran en el centro de reacción del PSI junto con las proteínas PsaA y PsaB (Nelson y Yocum, 2006). La clorofila excitada del P700 (P700*) cede electrones a la clorofila modificada A_0 , el siguiente aceptor es la filoquinona A_1 . A continuación intervienen proteínas ferrosulfuradas con tres centros o clústers de azufre F_x , F_A y F_B . Finalmente, los electrones llegan a la Fd, que se encuentra unida al PSI en el lado citoplasmático de la membrana tilacoidal. La FNR oxida a la Fd y transporta los electrones hasta $NADP^+$, generando NADPH (Figura 1). Los electrones procedentes de PC (o Cit C_6) vuelven a reducir P700 de nuevo.

A través de la membrana tilacoidal se produce un gradiente de protones, a partir de la fotólisis de H_2O en el PSII y PQH_2 en el Cit b_6f , que es utilizado para la síntesis de ATP mediante la ATPasa. Este proceso es conocido como fotofosforilación y se producen 3 moléculas de ATP a través de la rotación dependiente de H^+ de la ATPasa, una rotación que requiere 12 H^+ para generar 3 moléculas de ATP (Junge y Nelson, 2015) (Figura 1).

2.3 Transporte cíclico de electrones y rutas auxiliares

Las cianobacterias tienen que mantener un equilibrio *redox* fotosintético intracelular, donde el NADPH y el ATP se utilizan principalmente para la fijación de CO_2 (Mullineaux, 2014). Una excesiva reducción del LET provoca la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que terminará dañando a las proteínas y/o al ADN y que puede producir la muerte celular (Narainsamy et al., 2013). Debido a que las cianobacterias están expuestas a cambios rápidos en las condiciones ambientales, han desarrollado vías auxiliares para ajustar la relación ATP/NADPH y para responder a un aumento de la reducción del LET (Lea-Smith et al., 2016).

En el LET se ha establecido que la relación ATP/NADPH es de 1.33-1.5, aunque puede variar dependiendo del organismo (Behrenfeld et al., 2008; Bendall y Manasse,



INTRODUCCIÓN

1995). Durante la fijación de CO₂ se consumen 1.5 moléculas de ATP por cada NADPH, por lo tanto, es suficiente el ATP y NADPH generado en el LET. Sin embargo, las condiciones ambientales puede que no sean óptimas para el organismo y el ATP puede ser necesario en otras rutas de transporte o procesos de biosíntesis de compuestos. Debido a estas situaciones, los organismos fotosintéticos utilizan un transporte cíclico de electrones (CET), dependiente de la luz y con la implicación del PSI, para aumentar la relación ATP/NADPH (Peltier et al., 2016; Yamori y Shikanai, 2016). Durante el CET, los electrones del lado aceptor del PSI regresan al *pool* de PQ y producen un gradiente de protones (ΔpH) que permite la generación de ATP a través de la ATPasa (Berger et al., 1991) (Figura 1).

El CET se lleva a cabo a través del complejo NAD(P)H deshidrogenasa tipo I (NDH-1), estructuralmente relacionado con el complejo I de la NADH deshidrogenasa de bacterias y mitocondrias (Laughlin et al., 2019). Este complejo NDH-1 transfiere los electrones al *pool* de PQ (Battchikova et al., 2011; Mi et al., 1992; Peltier et al., 2016), generando el ΔpH y la consiguiente síntesis de ATP (Figura 1). Se ha descrito que la función del complejo NDH-1 es además la de mantener la respiración necesaria para el crecimiento en condiciones fotoheterotróficas en *Synechocystis* (Ohkawa et al., 2000). Recientemente, se ha resuelto la estructura de este complejo en *Thermosynechococcus elongatus* y se ha demostrado que existe un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal mediada por NDH-1, además se ha identificado a la Fd como donador de electrones del NDH-1 (Georg et al., 2017; He et al., 2015; Laughlin et al., 2019; Strand et al., 2017). Por otro lado, la proteína FNR presenta dos isoformas que parecen funcionar en direcciones opuestas, una forma larga o FNR_L que reduce NADP⁺ a NADPH y una forma corta o FNR_S que puede oxidar el NADPH, esta última isoforma parece estar relacionada con el CET (Thomas et al., 2006).

Otras vías alternativas incluyen flavoproteínas o *flavodiiron* (FLV) (Allahverdiyeva et al., 2013, 2015), que reducen O₂ y/o NO, posiblemente a partir de NADPH (Vicente et al., 2002) (Figura 1). En *Synechocystis* se han descrito cuatro FLV (Flv1-4), las Flv1 y Flv3 son esenciales en condiciones de luz fluctuante debido a su capacidad para proteger al PSI de fotoinhibición (Allahverdiyeva et al., 2013; Shimakawa et al., 2015, 2016). Por otro lado, Flv2 y Flv4 parecen estar involucradas en la fotoprotección del PSII en condiciones de alta intensidad lumínica y baja disponibilidad de carbono (Bersanini et al., 2014; Zhang et al., 2009, 2012). Además de las FLV, se ha descrito como determinadas oxidasas terminales respiratorias, tipo quinol oxidasa *bd* (Cyd) y tipo citocromo *c* oxidasa (COX), también actúan como “válvulas” de electrones en condiciones de luz fluctuante o alta intensidad lumínica (Ermakova et al., 2016; Lea-Smith et al., 2013; Shimakawa y Miyake, 2018). Mientras que la Cyd recibe electrones



desde PQH₂ (Berry et al., 2002), COX lo hace desde PC (o Cit C₆) (Howitt y Vermaas, 1998) y puede estar acoplada al transporte de protones a través de la membrana tilacoidal (Brändén et al., 2006; Iwata et al., 1995) (Figura 1).

2.4 Mecanismos de distribución y disipación de la energía

Para hacer frente a cambios en la intensidad lumínica a corto plazo, los organismos fotosintéticos han desarrollado mecanismos fotoprotectores que implican una reorganización y modificación transitoria de los componentes fotosintéticos. Los mecanismos de regulación relacionados con la eficiencia en la captación de la luz se han estudiado en detalle en cianobacterias, algas y plantas.

2.4.1. *Non-Photochemical Quenching*: OCP y Hlips

Cuando las cianobacterias se exponen a intensidades lumínicas muy elevadas la energía que se utiliza para llevar a cabo la actividad del PSII disminuye, evitando una acumulación de clorofilas excitadas que puedan producir un aumento excesivo de ROS (Krieger-Liszkay, 2004; Müller et al., 2001). El exceso de energía lumínica absorbida se disipa en forma de calor en un proceso que se denomina extinción no fotoquímica o *Non-Photochemical Quenching* (NPQ) (Bailey y Grossman, 2008; Kirilovsky, 2015).

En cianobacterias, se ha descrito la existencia de distintas formas de una proteína carotenoide naranja denominada OCP, unida a un cetocarotenoide y esencial en la activación de la respuesta NPQ (Bao et al., 2017; Boulay et al., 2008; Wilson et al., 2006, 2007). Además de la OCP, este mecanismo de NPQ requiere los PBS y una proteína de recuperación de la fluorescencia (FRP) (Boulay et al., 2010; Gwizdala et al., 2011; Sutter et al., 2013). La proteína OCP se activa cuando se produce un cambio conformacional en el cetocarotenoide inducido por un aumento en la intensidad lumínica (OCP^R) (Kirilovsky, 2015) (Figura 3A). Una vez activa, esta OCP^R se une a un trímero de aloficocianina e induce la extinción o *quenching* de la energía. La proteína FRP produce la separación de la OCP del PBS y la recuperación de la forma inactiva de la OCP en oscuridad o baja intensidad de luz (OCP^O) (Gwizdala et al., 2011; Kirilovsky, 2015). Además, existen datos acerca de la participación de los estados de transición en los procesos de disipación del exceso de energía en condiciones de intensidades lumínicas bajas, siendo la OCP más relevante en condiciones de intensidades lumínicas medias y altas (Takahashi et al., 2018).



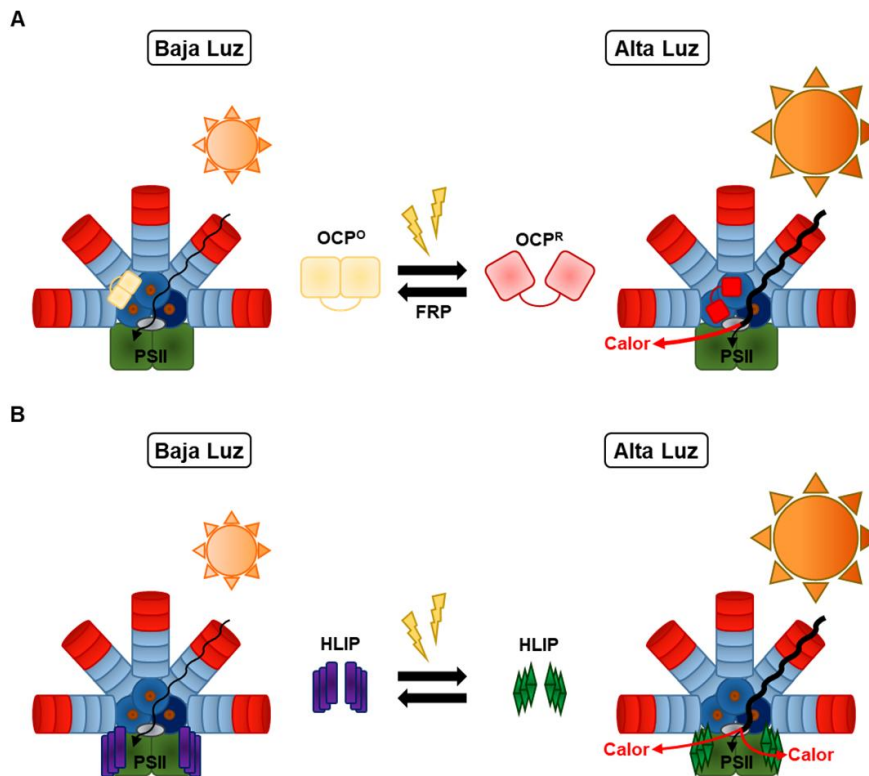


Figura 3. Mecanismos de protección del aparato fotosintético en cianobacterias. Disipación como calor del exceso de energía producida por cambios en la intensidad lumínica mediante el sistema OCP (A) o las proteínas HLIP (B). Modificado de Pathak et al., 2019.

En condiciones de alta intensidad lumínica, las cianobacterias además expresan unas proteínas pertenecientes a la familia de proteínas inducibles en alta luz denominadas HLIP, consideradas ancestros de la superfamilia de los complejos captadores de luz de algas y plantas (Dolganov et al., 1995; Engelken et al., 2010; Staleva et al., 2015). Estas proteínas tienen un papel fotoprotector ya que participan en la síntesis de proteínas de unión a clorofila (Chidgey et al., 2014), en el reciclaje de clorofila (Vavilin et al., 2007) o en el ensamblaje del PSII (Eaton-Rye y Sobotka, 2017; Knoppová et al., 2014; Komenda y Sobotka, 2016; Yao et al., 2007). Dos proteínas HLIP llamadas HliC y HliD forman un subcomplejo con la proteína Ycf39 (Ycf39-Hlip) que se asocia al complejo del centro de reacción de PSII excitado (CRII*) (Knoppová et al., 2014) (Figura 3B). La unión del subcomplejo Ycf39-Hlip con un beta-carotenoide y las clorofilas permiten la disipación del exceso de energía de excitación en el CRII* y protege al complejo del fotodaño (Knoppová et al., 2014; Staleva et al., 2015).



2.5 Fijación de CO₂ en cianobacterias

En cianobacterias, al igual que en algas y plantas, el producto final de la fotosíntesis son compuestos orgánicos de carbono generados a partir de la fijación de carbono inorgánico. Este proceso se lleva a cabo a través de las reacciones del ciclo de CBB y gracias al NADPH y ATP generado en las reacciones dependientes de luz. La enzima clave en el ciclo de CBB es la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco) que cataliza la incorporación de CO₂ en la ribulosa 1,5-bisfosfato (Ru1,5BP), con la formación de 2 moléculas de 3-fosfoglicerato (3PG) (Figura 4). Tras la formación de 3PG por la Rubisco, se produce una fase de reducción donde se genera una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (GAP), utilizada como precursora de azúcares más complejos (Raines, 2003). La formación de GAP desde 3PG tiene lugar en dos etapas catalizadas por las enzimas 3-fosfoglicerato quinasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, consumiendo una molécula de ATP y una molécula de NADPH. Finalmente tiene lugar la fase de regeneración que convierte azúcares de 3 carbonos en azúcares de 5 carbonos. En esta última fase, están involucradas diez enzimas y hay consumo de 1 molécula de ATP para producir 3 Ru1,5BP a partir de 5 GAP (Figura 4).

El proceso de fijación de carbono en las cianobacterias se lleva a cabo en unas estructuras icosaédricas denominadas carboxisomas (Kerfeld y Melnicki 2016). En el interior de los carboxisomas se encuentra la Rubisco, formada por las subunidades RbcL y RbcS (Whitney et al., 2011). Además de la carboxilación, la enzima Rubisco puede catalizar la oxigenación de la Ru1,5BP en un proceso conocido como fotorrespiración, que no es energéticamente útil y que produce intermediarios tóxicos (Hagemann et al., 2016; Raines, 2003). Debido a posibles limitaciones en la disponibilidad de carbono inorgánico, los organismos fotosintéticos han desarrollado estos carboxisomas o mecanismos de concentración de carbono que les permite aumentar la concentración de CO₂ cerca de la Rubisco y prevenir la fotorrespiración (Badger y Price, 2003; Burnap et al., 2015) (Figura 4). Por otro lado, existen varios mecanismos de captación de carbono inorgánico en cianobacterias, aunque no todos están presentes en todas las cianobacterias (Burnap et al., 2015; Kaplan, 2017; Price, 2011; Price et al., 2007). Hay tres transportadores de HCO₃⁻, BCT1, SbtA y BicA, que aumentan la concentración intracelular de HCO₃⁻ en el citoplasma. El HCO₃⁻ entrará en el carboxisoma, donde una anhidrasa carbónica lo convertirá en CO₂ (Burnap et al., 2015) (Figura 4). Además, existen dos sistemas relacionados con la absorción del CO₂ que accede a través de las porinas, el complejo constitutivo NDH-1MS' (o NDH-1₄) y el complejo NDH-1MS (o NDH-1₃) que se induce en presencia de bajos niveles de CO₂ (Battchikova et al., 2011; Burnap et al., 2015). Ambos complejos pueden convertir CO₂



en HCO_3^- en las membranas tilacoidales, aunque el mecanismo y su relación con el transporte de electrones fotosintéticos no se conocen en detalle (Price, 2011).

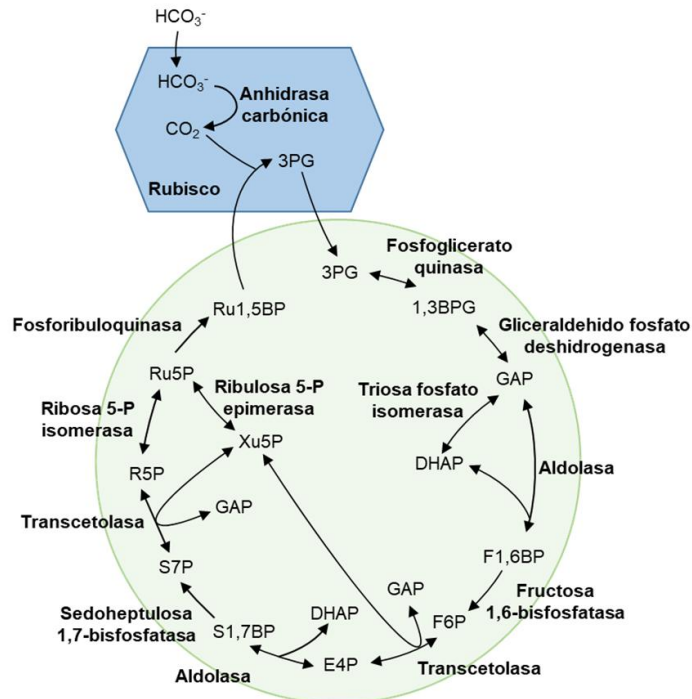


Figura 4. Ciclo de Calvin-Benson en cianobacterias. F6P, fructosa-6-fosfato; F1,6BP, fructosa 1,6-bisfosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehido-3-fosfato; 1,3BPG, 1,3-bisfosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; E4P, eritrosa-4-fosfato; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; S1,7BP, sedoheptulosa-1,7-bisfosfato; S7P, sedoheptulosa-7-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; Ru1,5BP, ribulosa-1,5-bisfosfato.

3. Metabolismo del carbono en cianobacterias

Las cianobacterias acumulan distintos polímeros de reserva como fuentes de energía para garantizar la supervivencia en periodos de déficit de algún nutriente. Para almacenamiento de carbono, el GAP procedente del ciclo de CBB puede ser convertido en hexosas fosfato a través de la gluconeogénesis y almacenarse en forma de glucógeno (Figura 5). La plasticidad que presentan las cianobacterias en el catabolismo de azúcares permite ajustar el nivel energético en todo momento para satisfacer las necesidades del metabolismo celular en condiciones cambiantes.

La glucosa 6-fosfato procedente de la degradación de glucógeno puede ser catabolizada a piruvato mediante diferentes rutas, produciendo ATP y NAD(P)H. Una de ellas es la vía glucolítica o Embden-Meyerhof-Parnas y otra es la vía Entner-Doudoroff (Figura 5) (Chen et al., 2016). Otra ruta para el catabolismo del glucógeno es la vía de las pentosas fosfato (OPP), que genera NADPH (Figura 5). Estas vías conducen al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que proporciona NADPH, FADH_2 , ATP y



metabolitos precursores de la biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos, oxaloacetato, 2-oxoglutarato y succinato. Además, el NADPH y el succinato se utilizarán también a través de la vía respiratoria (Figura 1). Respecto al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, las cianobacterias presentan variaciones que implican otras vías (Steinhauser et al., 2012; Zhang et al., 2016; Zhang y Bryant, 2011), aunque se ha descrito que el flujo metabólico a través del mismo es bajo (Wan et al., 2017).

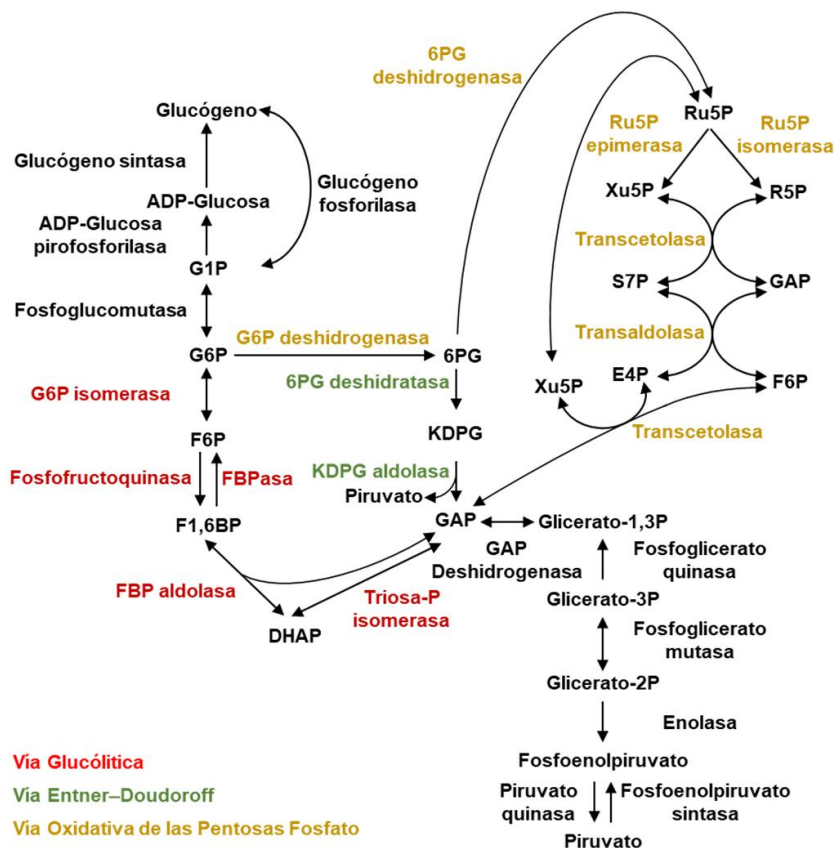


Figura 5. Diferentes rutas glucolíticas en cianobacterias. Representación esquemática de la vía Glucolítica o Embden-Meyerhof-Parnas (rojo), la vía Entner-Doudoroff (verde) y la vía Oxidativa de las Pentosas Fosfato (amarillo). G6P, glucosa-6-fosfato; G1P, glucosa-1-fosfato; KDPG, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; 6PG, 6-fosfogluconato. El resto de siglas se describen en la Figura 4. Modificado de Chen et al., 2016.

La mayoría de las cianobacterias acumulan glucógeno como la principal reserva de carbono, que utilizan durante la oscuridad para producir energía y para la formación de biomasa (Cano et al., 2018; Gründel et al., 2012; Saha et al., 2016). El glucógeno está formado por cadenas interconectadas de α -D-glucosa y forma gránulos visibles cuando se observa mediante microscopía electrónica (Allen, 1984). La síntesis de glucógeno se inicia en el citoplasma con la formación de ADP-glucosa a partir de



INTRODUCCIÓN

glucosa 1-fosfato y ATP, catalizada por la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (GlgC) (Figura 5). A continuación, la enzima glucógeno sintasa (GlgA) transfiere residuos de glucosa desde la ADP-glucosa y los une mediante enlaces glucosídicos α -1,4 a moléculas de glucógeno preexistentes (Yoo et al., 2014). *Synechocystis* presenta dos isoformas de la enzima GlgA (Beck et al., 2012; Gründel et al., 2012). Por último, una enzima ramificante (GlgB) introduce las ramificaciones α -1,6 entre las cadenas del polímero en crecimiento.

En la degradación de glucógeno, la enzima glucógeno pirofosforilasa (GlgP) cataliza la liberación de glucosa 1-fosfato, este azúcar fosforilado puede utilizarse como fuente de energía (Figura 5). En *Synechocystis* existen dos isoformas de GlgP que presentan diferencias en su patrón de expresión, indicando funciones fisiológicas diferentes (Doello et al., 2018; Fu y Xu, 2006). La enzima desramificante (GlgX) presenta una actividad transferasa que permite hidrolizar un trisacárido de glucosa, y transferirlo al extremo de otra cadena, quedando una molécula de glucosa unida por un enlace α -1,6. Y otra actividad α -1,6 glucosidasa que hidroliza este enlace y libera glucosa. La síntesis de glucógeno en cianobacterias está directamente relacionada con la fotosíntesis y presenta un patrón en el que hay síntesis de glucógeno en luz y degradación en oscuridad (Saha et al., 2016; Schneegurt et al., 1994). También está relacionada con la disponibilidad de carbono, de tal forma que cuanto mayor sea la disponibilidad de carbono mayor será la acumulación de glucógeno (Cano et al., 2018; Eisenhut et al., 2007). El equilibrio C/N intracelular también influye en la acumulación de glucógeno en la célula, de tal forma que cuanto mayor sea la disponibilidad de carbono, mayor será la acumulación de glucógeno, y la limitación nutricional de nitrógeno induce a una alta acumulación de este polímero (Forchhammer y Selim, 2019).

4. Sistemas *redox* en cianobacterias

Para el mantenimiento de la homeostasis *redox* intracelular, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de protección y detoxificación frente a diferentes agentes oxidantes a los que están expuestos. El estado *redox* celular puede ser alterado por las especies reactivas de oxígeno formadas a partir de oxígeno molecular (ROS), aunque también se han descrito las especies reactivas de nitrógeno (RNS) o las especies reactivas de azufre (RSS) en microalgas y plantas. Entre las RNS destaca el óxido nítrico, que se puede generar a partir de rutas no enzimáticas y enzimáticas, como por ejemplo a través de la enzima nitrato reductasa en los cloroplastos (Astier et al., 2017; Fernández et al., 2016; Pucciariello y Perata, 2017). Por otro lado, las especies reactivas de azufre (RSS) se producen a partir de la vía de asimilación de sulfatos debido a la actividad de la enzima sulfito reductasa o a través de otras enzimas como se ha



descrito en plantas (Gotor et al., 2010; Takahashi et al., 2011). Nos centraremos en la producción de ROS.

4.1 Producción de especies reactivas de oxígeno

La presencia de oxígeno en la atmósfera debido a la actividad fotosintética condujo a los organismos que estaban originalmente adaptados a un entorno anóxico, a hacer frente a posibles daños asociados al oxígeno en las rutas metabólicas. A partir del oxígeno molecular (O_2) se generan inevitablemente las ROS que pueden dañar componentes celulares como las proteínas, los lípidos o los ácidos nucleicos (Apel y Hirt, 2004). Dentro de las ROS se encuentran el oxígeno singlete (1O_2), el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidróxilo ($\bullet OH$), todos ellos fuertes agentes oxidantes (D'Autréaux y Toledano, 2007). Cuando la energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila no se disipa rápidamente, estas clorofilas fotoexcitadas en estado triplete se acumulan, interaccionan con el O_2 y generan el 1O_2 (Fischer et al., 2013). Este 1O_2 tiene una vida media corta pero puede reaccionar con proteínas, lípidos o pigmentos cercanos (Gorman y Rodgers, 1992), causando daños en estas moléculas (Figura 6). Otra fuente importante en la generación de ROS es el PSI, que puede reducir fácilmente el O_2 a $O_2^{\bullet-}$ debido al bajo potencial *redox* que presentan los centros Fe-S y a una limitación de los aceptores posteriores del PSI en el LET, que están totalmente reducidos (Latifi et al., 2009; Nishiyama et al., 2006) (Figura 6). Esta situación de limitación se produce cuando la fijación de CO_2 por el ciclo de CBB está afectado por la activación parcial de las enzimas que son dependientes de luz o por bajos niveles de CO_2 . Aunque el $O_2^{\bullet-}$ no es muy reactivo, puede oxidar los centros $[4Fe-4S]^{2+}$ a $[3Fe-4S]^{1+}$ y liberar hierro (Fe^{2+}) (Davies, 2016). Por otro lado, el $O_2^{\bullet-}$ se puede convertir en H_2O_2 a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Figura 6). Mediante la Reacción de Fenton, el H_2O_2 puede reaccionar con el ion ferroso (Fe^{2+}) para formar $\bullet OH$, que es una especie muy reactiva y dañina (Imlay, 2003). Además del PSI, también se ha propuesto la formación de $O_2^{\bullet-}$ a partir del *pool* de PQ, aunque no se conocen en detalle los mecanismos moleculares (Wang et al., 2016). El desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes que presentan los organismos, puede conducir a la muerte celular.



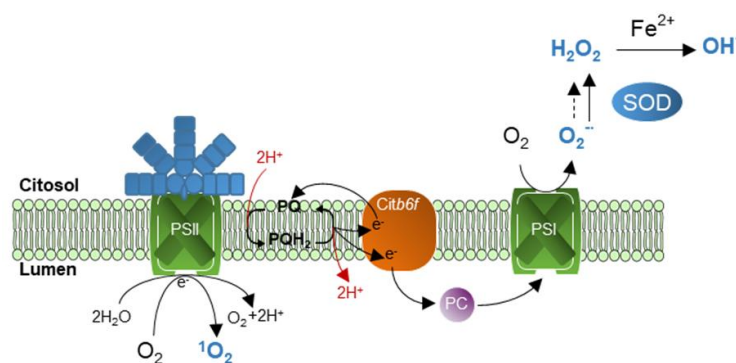


Figura 6. Producción de especies reactivas de oxígeno en las membranas tilacoidales de las cianobacterias. Generación de ROS a partir de la actividad fotosintética. Modificado de Zaffagnini et al., 2018.

4.2 Modificaciones redox de los grupos tiol

Los grupos tiol o sulfhidrilo de las cisteínas participan en numerosos procesos de señalización *redox* celular (Cooper et al., 2002; Dietz, 2003; Poole, 2015) e implican la modificación postraduccional de residuos de las cisteínas con función reguladora. El grupo tiol puede presentar diferentes formas, según acepte electrones (reducción) o ceda electrones (oxidación), produciendo un cambio en la función y/o estructura de la proteína. Además, las especies reactivas pueden producir cambios en la señalización *redox* mediante la modificación de estos grupos tiol (Buchanan y Balmer, 2005; Cooper et al., 2002; Zaffagnini et al., 2018).

El grupo tiol reactivo de la cisteína (Cys-SH) se encuentra normalmente en forma tiolada (Cys-S⁻). Esta forma ionizada es susceptible de oxidación por H_2O_2 generando ácido sulfénico (Cys-SOH) (Figura 7). En muchas ocasiones, Cys-S⁻ y Cys-SOH pueden formar puentes disulfuro con otros grupos tiol de la misma proteína (intramoleculares), o con el de otras proteínas o moléculas como el glutatión (GSH) (intermoleculares) (Poole y Nelson, 2008). La unión covalente del glutatión a los grupos tiol de las cisteínas se conoce como S-glutationilación (Cys-S-SG) (Poole et al., 2004) (Figura 7). Debido a que el H_2O_2 presenta un tiempo de vida mayor y es muy selectivo con respecto a otras especies reactivas (Paulsen y Carroll, 2013), el exceso de H_2O_2 puede producir ácido sulfínico (Cys-SO₂H) e incluso ácido sulfónico (Cys-SO₃H) por hiperoxidación (Cooper et al., 2002; Poole y Nelson, 2008). Tanto el ácido sulfínico como el ácido sulfónico son formas irreversibles y provocan la degradación de proteínas con la excepción del ácido sulfínico generado en la cisteína catalítica de algunas peroxirredoxinas (PRX), que es reversible al reducirse por las sulfirredoxinas en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP (Biteau et al., 2003; Jeong et al., 2012; Wood et al., 2003). Además, también puede producirse la oxidación por 1O_2 que, tras generar un intermediario de vida corta, puede



producir ácido sulfónico (Cys-SO₃H) o reaccionar con otro residuo (Cys-SH) (Figura 7). Aunque el O₂^{-•} presenta baja reactividad con las proteínas, puede formar un radical tiilo (Cys-S[•]) con una posterior peroxidación del grupo tiol (Cys-S-O-O[•]). Finalmente, el •OH puede oxidar a Cys-SH dando lugar a Cys-S[•] debido a que es muy reactivo. Es importante destacar que los radicales ¹O₂, O₂^{-•} y •OH presentan una alta reactividad por componentes biológicos distintos a las proteínas, por lo que pueden tener una influencia en la señalización *redox* muy limitada (para una revisión, Zaffagnini et al. 2018).

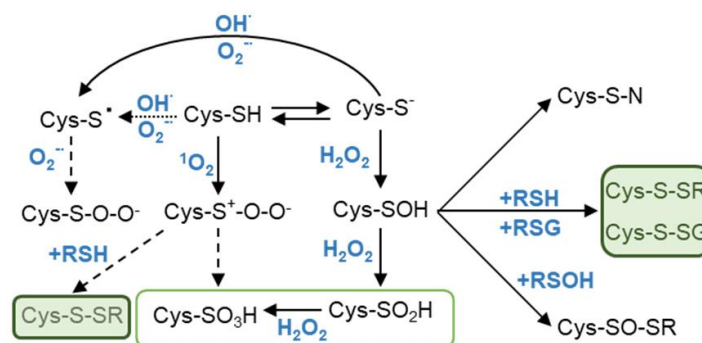


Figura 7. Mecanismos de oxidación por ROS de los grupos sulfidrilos de las cisteínas de las proteínas. Ácido sulfínico, Cys-SO₂H; Ácido sulfónico, Cys-SO₃H; Ácido sulfénico, Cys-SOH. Las líneas discontinuas indican reacciones posibles. Modificado de Zaffagnini et al., 2018.

4.3 Regulación *redox* en cianobacterias

Las cianobacterias pueden crecer fotoautotróficamente a partir de compuestos simples como el CO₂, distintas fuentes de nitrógeno y utilizando la luz solar como fuente de energía. La adaptación a las condiciones nutricionales produce cambios en el estado *redox* intracelular. La señalización y control *redox* en todos los organismos fotosintéticos ocurre fundamentalmente mediante dos sistemas, un sistema formado por las tiorredoxinas (TRX) y otro sistema formado por el glutatión y las glutaredoxinas (GRX) (Zaffagnini et al., 2018). Además, en todos los organismos fotosintéticos incluidas las cianobacterias, existen familias de proteínas con miembros que contienen en su estructura un dominio de TRX, como son las enzimas glutatión S-transferasas (GST) y las disulfuro isomerasas (PDI). El dominio TRX contiene los residuos típicos CXXC con la cisteína catalítica. Esta cisteína catalítica es responsable de formar un enlace disulfuro intermediario con la proteína diana, que se rompe por el ataque nucleofílico de otra cisteína (resolutiva) y libera la proteína diana en estado reducido, quedando el dominio TRX oxidado. También contienen un residuo de prolina en el extremo N-terminal, a 40 aminoácidos aproximadamente de CXXC y enfrenteado con la cisteína catalítica del sitio activo (Holmgren et al., 1975). Las TRX, GRX y PDI presentan sitios activos muy definidos, en cambio, las GST no contienen un sitio activo muy conservado.



Los sistemas TRX y GRX son los que juegan un papel muy importante en la modificación postraduccional.

4.3.1. Las tiorredoxinas

Las TRX son proteínas globulares de pequeño tamaño (≈ 12 kDa) presente en casi todos los organismos, y de manera particular en los organismos fotosintéticos (Baumann y Juttner, 2002; Jacquot et al., 2002). Presentan una estructura tridimensional denominada plegamiento “tipo tiorredoxina” que está compuesto por cuatro o cinco láminas β centrales rodeadas por tres o cuatro hélices α (Arné y Holmgren, 2000). Este plegamiento tipo tiorredoxina también está presente en los miembros de la familia de las oxidoreductasas de disulfuro (TRX, GRX, GST, SOD y PRX) (Martin, 1995).

Las TRX se caracterizan por presentar un sitio activo *redox* muy conservado, cuya secuencia de aminoácidos consenso es WC(G/P)C y donde las cisteínas pueden estar oxidadas formando un enlace disulfuro, o reducidas con grupos tioles altamente reactivos (potencial *redox* -270 y -300 mV). De esta forma pueden regular un gran número de procesos celulares a través de la reducción de puentes disulfuros específicos de sus proteínas diana (Holmgren et al., 2005).

Las TRX se identificaron inicialmente en *E. coli* como donadoras de hidrógeno a la enzima ribonucleótido reductasa (Laurent et al., 1964). Posteriormente, se describió su función en los organismos fotosintéticos a través de estudios en cloroplastos, donde se describió inicialmente la activación dependiente de Fd de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa del ciclo de CBB (Buchanan, 1980; Buchanan et al., 2002; Florencio et al., 2006). En los cloroplastos, se identificaron dos TRX (Trx *f* y Trx *m*) que regulan a través de mecanismos de óxido-reducción a algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo del carbono (Buchanan, 1980; Buchanan et al., 2002; Lemaire et al., 2007; Schürmann y Jacquot, 2000). Finalmente, se localizaron otras TRX en el citosol y en las mitocondrias de plantas (Florencio et al., 1988; Laloí et al., 2001). La secuenciación completa de los genomas en algas y plantas ha revelado la presencia de varios tipos de TRX, existiendo en el cloroplasto TRX de tipo *f*, *m*, *x* e *y* (Balmer y Buchanan, 2002; Geigenberger et al., 2017; Meyer et al., 2005; Motohashi et al., 2001), de tipo *h* en el citosol y las mitocondrias, y otros tipos exclusivos en mitocondrias (Arsova et al., 2010; Jacquot et al., 2009).

En cianobacterias se describió inicialmente la existencia de dos tipos de TRX en *Anabaena* sp. PCC 7119 (Yee et al., 1981). Una de ellas correspondía a una TRX de tipo *m* que fue la primera TRX clonada y caracterizada en estos organismos (Gleason y Holmgren, 1981). Posteriormente, la secuenciación completa de los genomas de



cianobacterias ha permitido la identificación, clonación y caracterización de otras TRX. El análisis filogenético ha revelado la existencia de cuatro tipos de TRX diferentes en cianobacterias (Florencio et al., 2006), tres de ellas están presentes en la mayoría de los organismos fotosintéticos denominadas de tipo *m* (TrxA), tipo *x* (TrxB) y tipo *y* (TrxQ). Una cuarta TRX, denominada TrxC, es exclusiva de cianobacterias y no presenta el sitio activo *redox* clásico (López-Maury et al., 2018). Además, muchas cianobacterias presentan otras TRX asociadas a membrana (Florencio et al., 2006).

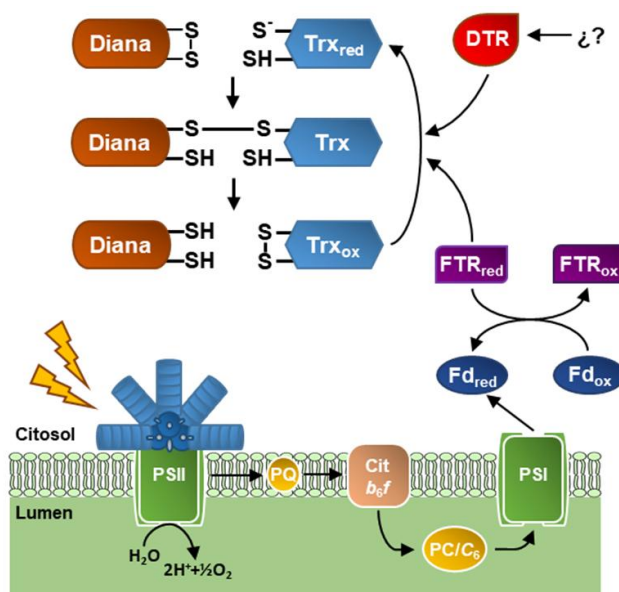


Figura 8. Sistemas de reducción de las tioredoxinas en las cianobacterias. Trx, tioredoxina; Trxred, tioredoxina reducida; Trxox, tioredoxina oxidada; Fdred, ferredoxina reducida; Fdox, ferredoxina oxidada; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II; Cit b6f, citocromo b6f; PQ, plastoquinona; DTR, tioredoxina reductasa deeply rooted.

Las cianobacterias que presentan un tamaño mayor del genoma tienen más isoformas de TRX (Florencio et al., 2006), donde la TrxA (tipo *m*) es la única TRX presente en todas las cianobacterias secuenciadas. Respecto al resto de TRX, la TrxB (tipo *x*) no se encuentra en los géneros de cianobacterias marinas ni en las especies *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. La TrxQ se distribuye entre los distintos géneros conocidos de cianobacterias y la TrxC presenta un sitio *redox* activo diferente al resto (WCGLC) y está presente en todos los genomas de las cianobacterias secuenciadas excepto en las cianobacterias marinas (Florencio et al., 2006). La determinación de los niveles celulares de todas las TRX en *Synechocystis* demostró que la TrxA presenta niveles de proteína mucho más altos que el resto de las TRX y similares a los niveles de la Trx1 de *E. coli* (Florencio et al., 2006).



INTRODUCCIÓN

Por otro lado, las enzimas tioredoxinas reductasas (TR) son responsables de reducir las TRX una vez oxidadas. En general existen dos TR en los organismos fotosintéticos: la Fd-tiorredoxina reductasa (FTR) y la NAD(P)H-tiorredoxina reductasa (NTR). En el sistema FTR/TRX, el poder reductor procede de la Fd, que a su vez es reducida por los electrones procedentes de la cadena de electrones fotosintética a través del PSI (Figura 8). En el sistema NTR/TRX, el poder reductor procede del NAD(P)H. La NTR está presente en los organismos heterótrofos y fotosintéticos, mientras que la FTR es exclusiva de organismos fotosintéticos (Florencio et al., 2006).

La FTR es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (FTRC) y una subunidad variable (FTRV) de 14 y 8.5 kDa, respectivamente (Buchanan et al., 2002; Schürmann y Buchanan, 2008). La FTRC está muy conservado entre los organismos fotosintéticos e incluye seis cisteínas (cuatro forman un grupo Fe-S y dos forman un puente disulfuro *redox* activo) (Jacquot et al., 2009; Sun et al., 2001). La FTRC recibe los electrones procedentes de la fotosíntesis a través de la Fd y reduce a las TRX posteriormente (Figura 8). Debido a que las TRX requieren dos electrones y la Fd no transfiere dos electrones simultáneamente, se ha propuesto un mecanismo de dos pasos con la formación de un complejo covalente entre FTR y TRX, y una posible interacción simultánea entre Fd, FTR y TRX (Jacquot et al., 2009; Walters et al., 2005). El origen de la FTRC parece estar vinculado a bacterias microaerófilas y quimioautotróficas muy antiguas, donde tendría una función en la regulación de la fijación de CO₂ a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos inverso. Posiblemente se incorporó a los organismos fotosintéticos sin cambio estructural importante (Balseira et al., 2013). La FTRV parece tener una función de protección del centro Fe-S frente al oxígeno (Balseira et al., 2013). El sistema FTR no está presente en todos los organismos fotosintéticos, y en ciertas especies de cianobacterias como *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 se ha planteado la posibilidad de que su función sea reemplazada por el sistema NTR (Balseira et al., 2013; Florencio et al., 2006).

La proteína NTR es un homodímero que presenta un motivo CXXC en el sitio activo, un sitio de unión al grupo prostético FAD (GXGXXG y TXXXVFAAGD) y un sitio de unión a NADPH (GXGXXA/G) (Dai et al., 1996; Jacquot et al., 2009). Los cambios conformacionales que se producen debido a la unión del NADPH permiten la reducción del FAD, este reduce el puente disulfuro, produciendo un giro que va a permitir la reducción de la TRX (Jacquot et al., 2009; Lennon et al., 2000). Estudios iniciales en *Mycobacterium tuberculosis* pusieron de manifiesto la existencia de otras proteínas con una NTR fusionada a una TRX (Wieles et al., 1995). Este tipo de NTR se localizó en el citosol y la mitocondria de organismos fotosintéticos superiores (Laloi et al., 2001;



INTRODUCCIÓN

Reichheld et al., 2005), y en cloroplastos de *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*, denominándose en este caso como NTRC (Serrato et al., 2004).

El estudio exhaustivo de los genomas completos de cianobacterias ha puesto de manifiesto que existe una gran diversidad de sistemas NTR, mayor que en plantas y algas. Todas las NTR presentes en cianobacterias están claramente separadas de las NTR de localización citosólica y mitocondrial de plantas y algas (Florencio et al., 2006). También, algunas cianobacterias presentan una proteína homóloga a la NTRC cloroplastídica de plantas. El estudio del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (en adelante *Anabaena*), ha permitido identificar un gen que codifica para una NTRC y un gen que codifica para una NTR localizada junto a un gen que codifica para una TRX inusual, sugiriendo que el origen de NTRC es a partir de la fusión de los genes que codifican para NTR y TRX en un procariota fotosintético ancestral (Florencio et al., 2006). Los estudios de caracterización de mutantes *ntrC* en *Anabaena* asignan una función antioxidante a esta proteína debido a su interacción con una PRX de tipo 2-Cys (2-Cys Prx) (Mihara et al., 2016; Sánchez-Riego et al., 2016). Respecto al resto de NTR, el análisis y estudio comparativo acerca de los sistemas de reducción FTR y NTR en *Synechocystis*, ha planteado la posibilidad de que la NTR esté vinculado a la defensa antioxidante mientras que la FTR al crecimiento celular, siendo ambos sistemas donadores de electrones para las TRX según las condiciones ambientales (Yoshida y Hisabori, 2016). Por otro lado, la ausencia de FTR en *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 y el estudio de posibles NTR en esta cianobacteria puso de manifiesto la existencia de diversas rutas de regulación *redox* entre las distintas cianobacterias (Buey et al., 2017b, 2017a; Mihara et al., 2019). El estudio de la estructura de una de estas NTR de *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (*glr0719*) ha determinado que existe un sitio de unión a FAD, pero no presenta el sitio de unión a NADPH característico y no une NADPH *in vitro*. Esta NTR ha sido renombrada como DTR (tioredoxina reductasa *deeply rooted*) y es capaz de reducir TRX aunque el donador fisiológico de electrones se desconoce (Buey et al., 2017b) (Figura 8). Por otro lado, el estudio de la estructura de otra NTR hipotética presente tanto en *Synechocystis* (*slr0600*) como en *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (*gll2934*), que inicialmente se asignó como la única TR con capacidad de reducir a la única TRX que presenta (TrxA) en *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, ha demostrado que esta contiene dos sitios de unión a FAD, no tiene capacidad de reducir TRX y posiblemente presente una función oxidasa. Este tipo ha sido renombrada como DDOR y es una disulfuro oxidoreductasa unida a dos flavinas (DDOR) (Buey et al., 2017a).

Respecto a las funciones que desempeñan las TRX, se han abordado a través de distintos enfoques que implican la caracterización de mutantes y la identificación de



INTRODUCCIÓN

proteínas diana. Se han realizado desde estudios comparativos utilizando isoformas purificadas de TRX y proteínas diana hasta estrategias proteómicas para identificar proteínas diana de TRX. Los primeros estudios proteómicos se llevaron a cabo utilizando una TRX monocisteínica, donde la cisteína resolutive del sitio activo es reemplazada por una serina, permitiendo la formación de un complejo entre las proteínas diana y la TRX. Los complejos se purificaron mediante separación en geles 2D SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, e identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Este tipo de aproximación se ha utilizado en estudios realizados en *Synechocystis* y en *Anabaena* con TrxA, TrxB y TrxQ (Lindahl y Florencio, 2003; Nomata et al., 2015; Pérez-Pérez et al., 2006, 2009a), identificando una serie de posibles proteínas dianas relacionadas con distintos procesos celulares (Figura 9), y en organismos fotosintéticos superiores (para una revisión, Zaffagnini et al. 2018). En el caso de las cianobacterias, estas aproximaciones proteómicas en general mostraron una baja especificidad entre las TRX y sus dianas debido a que no se han obtenido grandes diferencias entre las dianas detectadas en cada caso.

Otra estrategia para identificar posibles dianas de TRX, ha sido el etiquetado de las cisteínas libres mediante sondas radiactivas, fluorescentes o biotiniladas, tras un paso inicial de bloqueo de las cisteínas reducidas y la posterior reducción de las oxidadas. Esta estrategia, en combinación con la espectrometría de masas con diferentes modificaciones, se han aplicado en plantas (Zaffagnini et al. 2018), en algas (Pérez-Pérez et al., 2017) y en cianobacterias (Ansong et al., 2014; Guo et al., 2014; Sadler et al., 2014). En *Synechococcus* sp. PCC 7002 y utilizando sondas químicas, se han identificado hasta 176 proteínas con cambios *redox* en algunas cisteínas tras restituir los niveles de CO₂ en medios de cultivo limitados en CO₂ (Sadler et al., 2014). En esta misma especie se han descrito hasta 300 proteínas *redox* activas en los cambios de luz a oscuridad (Ansong et al., 2014). Además, también se han utilizado aproximaciones que implican la identificación de tioles libres mediante enriquecimiento por afinidad con tiol asistido por resina. En estos protocolos, tras someter a los extractos celulares de cianobacterias a la precipitación con ácido tricloroacético (TCA), se tratan con N-etilmaleimida (NEM) para bloquear las cisteínas reducidas. Posteriormente, las cisteínas oxidadas se reducen con DTT y se marcan con unas etiquetas específicas para espectrometría de masas en tándem (TMT), que finalmente se analizan mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Esta aproximación ha permitido detectar en *Synechocystis* que entre un 20-40% de las proteínas presentan cisteínas oxidadas en oscuridad, aunque no aporta información sobre el origen de la modificación de la cisteína (Guo et al., 2014). A pesar de esto, en todas las dianas identificadas que están catalogadas como posibles, tanto la formación



de un puente disulfuro como su reducción por TRX debe confirmarse experimentalmente.

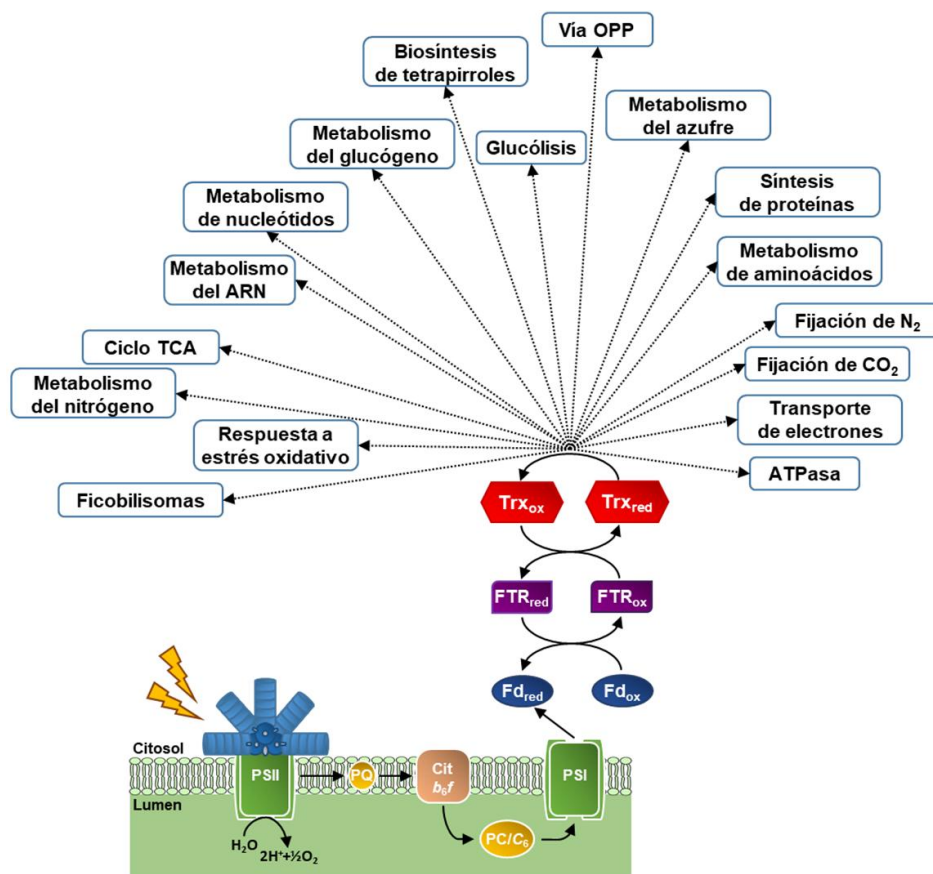


Figura 9. Procesos celulares regulados por las TRX basado en los estudios proteómicos realizados en *Synechocystis* y *Anabaena*. Procesos celulares establecidos a partir de posibles proteínas diana identificadas en tres estudios proteómicos en *Synechocystis* (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006) y un estudio en *Anabaena* (Nomata et al., 2015).

En los últimos años, la caracterización de estirpes mutantes de las TRX presentes en plantas y algas han confirmado que las TRX tipo *f* y *m* están relacionadas con funciones metabólicas ya que activan enzimas del ciclo de CBB, de la síntesis de almidón o a la ATP sintasa entre otras. Las TRX de tipo *m* presentan funciones *in vivo* más variadas que las TRX de tipo *f*, ya que están implicadas en la regulación del CET, la síntesis de clorofila, la activación rápida de la enzima malato deshidrogenasa, la adaptación a luz fluctuante o incluso el desarrollo de meristemas (Geigenberger et al. 2017; Nikkanen y Rintamäki 2019). Con respecto a las TRX de tipo *x* e *y*, estas presentan un papel antioxidante debido que intervienen en la reducción de diferentes PRX (Laugier et al., 2013; Ojeda et al., 2018; Pulido et al., 2010). En plantas, además del sistema FTR/TRX, la proteína NTRC tiene un papel importante como regulador *redox*



INTRODUCCIÓN

en las transiciones de luz a oscuridad (Pérez-Ruiz et al., 2006), y como mecanismo antioxidante tras identificar a la 2-Cys Prx como diana (Pulido et al., 2010). En plantas, los mutantes *ntrc* presentan defectos en el crecimiento y una incompleta activación de algunas enzimas del ciclo de CBB, inicialmente relacionadas con el sistema FTR/TRX. A pesar de esto, la NTRC no reduce eficientemente a las TRX ni a muchas de las proteínas diana de TRX, planteando un efecto indirecto de NTRC (Yoshida y Hisabori, 2016). De hecho, un estudio reciente utilizando un doble mutante *ntrc-Δcp* que carece de NTRC y tiene bajos niveles de 2-Cys Prx, indica que ambas proteínas actúan de manera coordinada ya que este mutante recupera el fenotipo de la estirpe silvestre. Esto implica que el fenotipo de un mutante simple *ntrc* está relacionado con un desequilibrio *redox* generado por el sistema FTR/TRX para mantener los niveles reducidos de la 2-Cys Prx, que conduce a una inactivación parcial del resto de proteínas diana de las TRX. De esta forma, NTRC mantiene unos niveles de 2-Cys Prx reducidos y mantiene la capacidad del sistema FTR/TRX para reducir sus dianas (Pérez-Ruiz et al., 2017).

En cianobacterias, las posibles funciones de las diferentes TRX se han abordado mediante la caracterización de algunas estirpes mutantes de TRX y de sus donadores de electrones. Estos estudios han permitido confirmar experimentalmente la regulación *redox* de algunas proteínas diana identificadas en las aproximaciones proteómicas, aunque los estudios no son tan extensos como en plantas y algas. Además, existe cierta controversia en algunos de los resultados obtenidos en *Synechocystis*, debido al uso de una estirpe mutante en el gen *ntr* (*slr0600*), que codifica la proteína DDOR y que, como se ha comentado anteriormente, no es un donador de TRX. Por otro lado, las cianobacterias presentan todas las actividades metabólicas y las rutas de regulación en el interior celular, a diferencia de la compartimentación existente en organismos superiores.

Además de los estudios proteómicos, se han llevado a cabo análisis de coexpresión en *E. coli* para detectar interacciones entre TRX y factores transcripcionales, posibles dianas en *Synechocystis*. El análisis de diez factores transcripcionales tipo OmpR ha permitido identificar a tres de ellos como posibles dianas de TrxA (RpaA, RpaB y ManR). RpaA y RpaB son factores transcripcionales globales mientras que ManR regula el operón *mntCAB*, responsable del transporte de manganeso (Kadowaki et al., 2015). Otro factor transcripcional dependiente de TRX identificado en *Synechocystis* ha sido PedR (Nakamura y Hihara, 2006). Este factor transcripcional regula genes relacionados con la síntesis de clorofila, el CET y el ciclo de CBB. El análisis del estado *redox in vitro* utilizando TrxA y TrxB, e *in vivo* utilizando un mutante de la FTRV (*ftr-v*) confirmarían la regulación *redox* (Horiuchi et al., 2010). En *Anabaena*, un factor transcripcional denominado RexT actúa como represor del gen



INTRODUCCIÓN

trxA2 (*all1866*) en condiciones estándar debido a la existencia de un sitio de unión para este factor delante del gen *trxA2* (Ehira y Ohmori, 2012). El gen *rexT* se encuentra aguas arriba del gen *trxA2* y está conservado en distintas cianobacterias. La actividad represora de RexT desaparece tras la formación de un puente intramolecular entre dos cisteínas en presencia de H₂O₂, induciendo la expresión del gen *trxA2*. Su actividad de represión se recupera en presencia de TrxA2 reducida (Ehira y Ohmori, 2012). La identificación de factores transcripcionales dependientes de TRX nos permite establecer un papel relevante de estas TRX en la regulación transcripcional dependiente del transporte de electrones fotosintético en cianobacterias (Wilde y Hihara, 2016). Algunos de estos factores transcripcionales y otros nuevos también se han identificado en los diferentes estudios proteómicos que se han llevado a cabo en *Synechocystis* y *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ansong et al., 2014; Guo et al., 2014; Sadler et al., 2014). A pesar de esto, el número de factores transcripcionales conocidos son escasos y los mecanismos reguladores deben estudiarse con más profundidad.

La síntesis de proteínas también parece estar regulado por TRX en las cianobacterias, en concreto a través de los factores de elongación G y Tu (EF-G y EF-Tu). Estos factores de elongación son proteínas que unen GTP y catalizan la translocación del peptidil-tRNA. Se ha escrito que los EF-G de *Synechocystis*, codificados por tres ORF diferentes, son sensibles a ROS y se inactivan reversiblemente mediante oxidación-reducción (Kojima et al., 2007). La caracterización *in vitro* de uno de estos factores determinó que dos cisteínas se oxidan en presencia de H₂O₂ y se reducen por TrxA (Kojima et al., 2009). A pesar de estos resultados *in vitro*, el estudio *in vivo* del EF-G se realizó utilizando un mutante *ntr*, que no es una TR como hemos comentado anteriormente, sugiriendo la existencia de otras vías de regulación *redox* (Kojima et al., 2009). Además, las cisteínas identificadas en el estudio *in vitro* son diferentes a las cisteínas identificadas en el estudio proteómico realizado en condiciones de luz y oscuridad (Guo et al., 2014). Por otro lado, el EF-Tu también puede ser reducido y activado *in vitro* por TrxA (Yutthanasirikul et al., 2016). Los estudios *in vivo* detectaron la formación de dímeros durante una exposición a alta intensidad lumínica en la estirpe silvestre, mientras que en un mutante *ftr-v* existe una mayor fracción de dímeros y oligómeros (Yutthanasirikul et al., 2016). Aunque posteriormente, un nuevo estudio *in vivo* realizado por el mismo grupo, ha permitido observar la formación de ácido sulfénico después de la exposición a alta intensidad lumínica, y no se han observado dímeros ni oligómeros (Jimbo et al., 2018). Esta situación refleja nuevamente la necesidad de realizar más estudios sobre el estado *redox* del EF-Tu.

En *Anabaena* se ha confirmado la participación de dos isoformas de TrxA, Trx-*m1* (*alr0052*) y Trx-*m2* (*all1866*), en la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato



deshidrogenasa (G6PDH) a través su proteína activadora OpcA (Mihara et al., 2018). La reducción de OpcA por TrxA produce la inactivación de G6PDH en presencia de luz y nitrato en el medio. Esta desactivación es importante para evitar pérdidas del carbono fijado por el ciclo de CBB. Durante la fijación de N₂, la proteína OpcA es oxidada parcialmente, posiblemente debido a la necesidad de proporcionar poder reductor a la enzima nitrogenasa por parte de la G6PDH (Mihara et al., 2018). El estudio *in vivo* del estado *redox* de la OpcA en los mutantes simples de las dos isoformas de TrxA en *Anabaena*, permitió observar unos niveles mayores de la forma oxidada en el mutante *trx-m1* con respecto a la estirpe silvestre, aunque en presencia de nitrato en el medio y sin que se observen diferencias fenotípicas. El cambio a las condiciones diazotróficas produce la oxidación de la OpcA en la estirpe silvestre y en el mutante *trx-m2*, aunque mantiene los mismos niveles de óxido-reducción en el mutante *trx-m1*. Curiosamente, el mutante *trx-m1* no crece en condiciones diazotróficas (Deschoenmaeker et al., 2019; Mihara et al., 2018).

En *Synechocystis*, la caracterización de mutantes *trxB* y *trxQ* han mostrado que estos presentan sensibilidad a alta luz y estrés oxidativo inducido por metil viológeno respectivamente (Pérez-Pérez et al., 2009a). TrxB y TrxQ pueden interaccionar *in vitro* y reducir las distintas PRX presentes en *Synechocystis*, siendo TrxQ la más eficiente (Pérez-Pérez et al., 2009b). En el caso de TrxC, el mutante de esta TRX en *Synechocystis*, no presenta ningún fenotipo en condiciones estándar de crecimiento aunque parece jugar un papel en la adaptación a bajos niveles de carbono y alta intensidad lumínica (López-Maury et al., 2018). En *Anabaena*, el mutante que carece de esta TRX muestra sensibilidad a estrés oxidativo en presencia de nitrato (Deschoenmaeker et al., 2018). A pesar de ello, no se han validado experimentalmente posibles dianas de estas tres TRX (TrxB, TrxQ y TrxC) *in vivo*. En el caso de TrxA, es la única TRX esencial en cianobacterias y por tanto, no se han asociado fenotipos específicos (Muller y Buchanan, 1989; Navarro y Florencio, 1996). Recientemente se han descrito mutantes de alguna de las isoformas de TrxA en *Anabaena* como hemos comentado anteriormente (Deschoenmaeker et al., 2018, 2019, Mihara et al., 2018, 2019), aunque no existe un mutante sin ninguna isoforma de TrxA en cianobacterias, ni en otros organismos fotosintéticos.

4.3.2. Las glutarredoxinas

Las GRX son proteínas globulares pequeñas (≈10-15 kDa) presentes en la mayoría de organismos. Se agrupan dentro de la familia de las oxidoreductasas de disulfuro y su estructura se caracteriza por el plegamiento “tipo tiorredoxina” (Martin, 1995). El centro activo *redox* puede contener dos cisteínas (CXXC, GRX tipo ditiólica) o



una cisteína (CXXS, GRX tipo monotiólica) (Holmgren, 1968). Presentan un potencial *redox* más positivo que las TRX (desde -190 a -230 mV) que les permiten actuar como las TRX, reduciendo puentes disulfuro intramoleculares (Åslund et al., 1997), intermoleculares o por unión a glutatión (S-glutationilación). En organismos fotosintéticos se clasifican en función del centro activo y del sitio de unión al GSH, existiendo varias clases (Couturier et al., 2009). *Synechocystis*, presenta tres GRX: 2 tipo ditiólica (GrxA y GrxB) y 1 tipo monotiólica (GrxC).

Las GRX ditiólicas reducen puentes disulfuro de la misma forma que las TRX, la regeneración de la GRX reducida se realiza por dos moléculas de GS⁻ o la enzima glutatión reductasa (GR) y NADPH (Figura 10A). Por otro lado, las GRX monotiólicas reducen puentes disulfuro entre glutatión y una proteína diana, en un proceso llamado deglutationilación (Figura 10B). La reducción del puente disulfuro da lugar a que la proteína diana quede reducida y la GRX quede unida al glutatión (Vlamiš-Gardikas y Holmgren, 2002; Zaffagnini et al., 2018). La reducción de las GRX de nuevo puede ser realizado a través de otra molécula de GS⁻, que tras ser oxidada es nuevamente reducida mediante la enzima GR y NADPH (Lemaire et al., 2007), aunque también se han descrito otros sistemas (Zaffagnini et al., 2018) (Figura 10B). *Synechocystis* no presenta GR y se ha propuesto que una Fd y/o la DDOR pueden reducir algunas GRX en condiciones de estrés por metales (Marteyn et al., 2008). La deglutationilación puede ser llevada a cabo también por GRX ditiólicas debido a que solo es necesaria una sola cisteína catalítica (Zaffagnini et al., 2018).

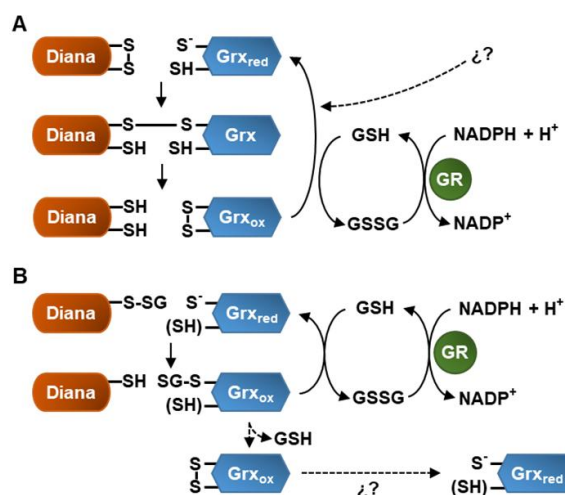


Figura 10. Mecanismos de acción de las glutarredoxinas en las cianobacterias. (A) Mecanismo ditiólico. **(B)** Mecanismo monotiólico, ejemplos de deglutationilación. Grx, glutarredoxina; Grx_{red}, glutarredoxina reducida; Grx_{ox}, glutarredoxina oxidada; glutarredoxina reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión disulfuro. Las líneas discontinuas indican reacciones posibles. Modificado de Zaffagnini et al., 2018.



INTRODUCCIÓN

Se ha asumido que las GRX y TRX presentan funciones superpuestas debido a la alta homología estructural, aunque existen evidencias entre las que destacan los distintos potenciales *redox* que presentan y que parecen indicar diferencias funcionales (Åslund et al., 1997). En cianobacterias, las funciones de las GRX no están claras aunque en *Synechocystis* se han relacionado con la respuesta a metales y metaloides, y estrés oxidativo (Kim et al., 2012; Li et al., 2007; López-Maury et al., 2009; Marteyn et al., 2008; Sánchez-Riego et al., 2013). Además y utilizando una GrxA monocisteínica para análisis proteómico, se han identificado 42 posibles diana relacionadas con hasta 12 procesos celulares diferentes como estrés oxidativo, ciclo de CBB o síntesis de proteínas entre otros (Li et al., 2007). Por último, un análisis de las proteínas S-glutationiladas ha permitido identificar en *Synechocystis* proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono y nitrógeno, defensa frente a estrés oxidativo, factores relacionados con la división celular y producción de hidrógeno (Chardonnet et al., 2015).

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



II. OBJETIVOS DE LA TESIS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la caracterización *in vivo* de la función de TrxA en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

1. Generación y caracterización fenotípica de una estirpe mutante condicional con bajos niveles de la tiorredoxina TrxA.
2. Análisis de la respuesta fenotípica a la disminución de los niveles de TrxA en diferentes condiciones de crecimiento.
3. Análisis del transcriptoma de una estirpe mutante con bajos niveles de TrxA.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

III. MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

1. Organismos y condiciones de cultivo

1.1 Cianobacterias

1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas

El presente trabajo se ha realizado utilizando la cianobacteria *Synechocystis*, perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica establecida por Rippka (Rippka et al., 1979). Las estirpes mutantes de *Synechocystis* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	ORF mutada	Referencia
6803	<i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	-	Colección del laboratorio
SARSR	<i>arsR::cmf</i>	<i>slr1957</i>	Colección del laboratorio
STXA2P	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}]</i>	<i>slr0288</i>	Este trabajo
STXA3P	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}]</i>	<i>slr0288</i>	Este trabajo
STXA2	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] trxA::sp'</i>	<i>slr0288</i> y <i>slr0623</i>	Este trabajo
STXA3	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] trxA::sp'</i>	<i>slr0288</i> y <i>slr0623</i>	Este trabajo
SRTXA2P	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] arsR::C.C1</i>	<i>slr0288</i> y <i>slr1957</i>	Este trabajo
SRTXA3P	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] arsR::C.C1</i>	<i>slr0288</i> y <i>slr1957</i>	Este trabajo
SRTXA2	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] trxA::sp'</i> <i>arsR::C.C1</i>	<i>slr0288</i> , <i>slr0623</i> y <i>slr1957</i>	Este trabajo
SRTXA3	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] trxA::sp'</i> <i>arsR::C.C1</i>	<i>slr0288</i> , <i>slr0623</i> y <i>slr1957</i>	Este trabajo
SNTRC	<i>nrsD[P_{cpcBntrC::km}]</i>	<i>slr0796</i>	Este trabajo
STXAC	<i>glnN[P_{arsBtrxA::nat}] trxA::sp'</i> <i>nrsD[P_{cpcBntrC::km}]</i>	<i>slr0288</i> , <i>slr0623</i> y <i>slr0796</i>	Este trabajo

1.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las estirpes de *Synechocystis* se cultivaron fotoautotróficamente en medio BG11 (Rippka et al., 1979), este medio suplementado con 12 mM de NaHCO₃ se denomina BG11C y su composición se detalla en la Tabla 2.

Para el crecimiento de las estirpes mutantes resistentes a antibióticos, el medio se suplementó con el antibiótico o los antibióticos requeridos. Los antibióticos se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio previamente autoclavado. Las concentraciones utilizadas aparecen en la Tabla 3.



Tabla 2. Composición del medio de cultivo BG11C.

Composición		Composición	
NaNO ₃	17.6 mM	Citrato férrico-amónico (17% Fe)	6 mg/l
MgSO ₄	0.30 mM	MnCl ₂	9,1 µM
CaCl ₂	0.24 mM	Na ₂ -EDTA	2,4 µM
Na ₂ CO ₃	0.20 mM	Na ₂ MoO ₄	1,6 µM
K ₂ HPO ₄	0.20 mM	ZnSO ₄	0,8 µM
H ₃ BO ₃	46 µM	CuSO ₄	0,3 µM
Ácido cítrico	28.5 µM	CoCl ₂	0,2 µM

El crecimiento de los cultivos para los experimentos fisiológicos estándares se realizó en medio líquido y condiciones de burbujeo en aire suplementado con 1% CO₂ (v/v) en frascos de Roux de 750 ml o tubos cilíndricos de 40 a 180 ml, a 30°C y bajo iluminación continua (50 µmol fotones·m⁻²·s⁻¹) suministrada por paneles de tubos LED. También se utilizaron matraces Erlenmeyer de 100 y 250 ml incubados a 100 rpm y en agitadores orbitales IKA Laborthechnik KS501 termostatizados a 30°C y en las mismas condiciones de iluminación. En el caso de los estudios de estrés lumínico, se utilizaron diferentes intensidades lumínicas: 200 µmol fotones·m⁻²·s⁻¹, 500 µmol fotones·m⁻²·s⁻¹ o 1000 µmol fotones·m⁻²·s⁻¹.

Tabla 3. Antibióticos utilizados en las estirpes de *Synechocystis*.

Antibiótico	Concentración
Kanamicina	50 µg/ml
Espectinomicina	5 µg/ml
Estreptomina	5 µg/ml
Cloranfenicol	20 µg/ml
Nourseotricina	50 µg/ml

El cultivo en medio sólido se realizó utilizando el medio BG11C estéril suplementado con agar (Bacto-Agar, Difco) al 1% (p/v). La esterilización de los medios y el resto de materiales se realizó en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Las sales y el agar se autoclavaron por separado, disueltos en la mitad de volumen, y se mezclaron una vez esterilizados. El medio preparado se vertió en placas de Petri (50 ml/placa). Las condiciones de iluminación fueron las mismas que las descritas para medios líquidos.

En los estudios de estrés oxidativo, las diferentes estirpes de *Synechocystis* se cultivaron en medio BG11C líquido con metil viológeno (5 µM).

Para el estudio del crecimiento mixotrófico y fotoheterotrófico de las estirpes mutantes de *Synechocystis*, se añadió al medio BG11C líquido, 10 mM de glucosa, o 10 mM de glucosa y 20 µM de DCMU (3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilurea),



MATERIALES Y MÉTODOS

respectivamente. En estas condiciones los experimentos se realizaron a una intensidad lumínica de $15 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

De manera general en este trabajo, los cultivos de las estirpes de *Synechocystis* cultivadas en medio BG11C y en presencia de 1 mM de arsenito sódico (NaAsO_2), se lavaron y resuspendieron en medio BG11C líquido con o sin arsenito. En los experimentos de recuperación, los cultivos sin arsenito se dividieron y a uno de ellos se le añadió arsenito.

1.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

1.2.1. Estirpe de *E. coli* utilizada

La estirpe de *E. coli* utilizada en este trabajo y el genotipo correspondiente se recoge en la tabla 4.

Tabla 4. Estirpe de *E. coli* utilizada en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>mK+</i> , <i>rK-</i>) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80- <i>lacZ</i> Δ M15)	(Hanahan, 1983)

1.2.2. Medios y condiciones de cultivo

En el caso de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio de cultivo de Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), cuya composición se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo LB.

Composición	Concentración
NaCl	10 g/l
Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

El medio sólido se preparó añadiendo agar a una concentración final de 1.5% (p/v). Los medios se autoclavarón de la misma forma que la descrita en el apartado 1.1.2. Por último, los medios líquidos y sólidos se suplementaron cuando fue necesario con los antibióticos detallados en la tabla 6.

Para los cultivos en medio líquido se utilizaron tubos de 10 ml o matraces Erlenmeyer de 100, empleando un volumen de cultivo equivalente a 1/5 de la capacidad del tubo o matraz. En todos los casos se incubaron a 37°C y con agitación orbital continua de 200 rpm en equipos Innova@43 de New Brunswick Scientific. En el caso de los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri estériles incubándose a 37°C en estufa.



Tabla 6. Antibióticos utilizados en las estirpes de *E. coli*.

Compuesto	Concentración
Kanamicina	50 µg/ml
Espectinomicina	100 µg/ml
Estreptomina	100 µg/ml
Cloranfenicol	40 µg/ml
Nourseotricina	50 µg/ml
Ampicilina	100 µg/ml

1.3 Métodos de recogida de células

La recogida de células tanto de *E. coli* como de *Synechocystis* se realizó por centrifugación, utilizando diferentes tipos de centrifugas según el volumen de cultivo de recogida: microcentrífuga Eppendorf 5415R a temperatura ambiente o en centrifuga refrigerada (tubos de 1.5 o 2 ml), en centrifuga Eppendorf 5804R (tubos tipo de 15 o 50 ml), centrífuga Beckman Avanti J-25 (tubos GSA de 250 ml) o centrífuga Sorvall RC5C (tubos específicos de 1000 ml). En los casos en los que se cambió el medio de cultivo, se realizó a temperatura ambiente.

2. Métodos de Biología Molecular

2.1 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

2.1.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos procedentes de STAB VIDA utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Olinucleótido	Secuencia 5'→3'	Características
TrxA_Ndel	AATTCATATGAGTGCTAC CCCTCAAG	Utilizado para amplificar el gen <i>trxA</i> con diana de restricción para <i>NdeI</i> en el extremo 5'.
TrxA_NotI	AATTGCGGCCGCCACAA AGCAGGGAAGCCAG	Utilizado para amplificar el gen <i>trxA</i> con diana de restricción para <i>NotI</i> en el extremo 3'.
ParsB_EcoRI_F	TTCGAATTCTCGTTCTTG GCTCATACC	Utilizado para amplificar un fragmento de 435 pb junto con PArS_B_TrxA_5'_R. Introduce una diana de restricción para <i>EcoRI</i> .
PArS_B_TrxA_5'_R	GTAGCACTCATGACAAC TCATCAAAAAAATTGAT GG	Utilizado para amplificar un fragmento de 435 pb junto con ParsB_EcoRI_F.



MATERIALES Y MÉTODOS

PArsB_TrxA_5'_F	GATGAGTTGTCATGAGT GCTACCCCTCAAGTTTC C	Utilizado para amplificar un fragmento de 353 pb junto con TrxA_3'_R.
TrxA_3'_R	AATTAATTGCGGCCGCT TATTAAGATATTTTCTA GGG	Utilizado para amplificar un fragmento de 353 pb junto con PArSB_TrxA_5'_F. Introduce una diana para <i>NotI</i> en en el extremo 3'.
glnN_check_F (50)	ATGCAGGCCAGTCTTCC TAA	Utilizado para comprobar la segregación de estirpes mutantes junto con glnN_check_R y Prom_Ck1_R.
glnN_check_R (51)	AAATGGCAGTGTCCAAG TCC	Utilizado para comprobar la segregación de estirpes mutantes junto con glnN_check_F y Prom_Ck1_R.
Prom_Ck1_R (41)	AAGAGTGGTACCCATGG TAAACGATCCTCATCCTG TCTC	Utilizado para comprobar la segregación de estirpes mutantes junto con glnN_check_F y glnN_check_R.
5_nrsD_BssHII_F (209)	AAGCGCGCCTTTCACTG CTTGCGGAACC	Utilizado para comprobar la segregación de estirpes mutantes junto con 3_nrsD_BssHII_R (207)
3_nrsD_BssHII_R (207)	AAGCGCGCCTCGGAGTC ATGGTGATGGG	Utilizado para comprobar la segregación de estirpes mutantes junto con 3_nrsD_BssHII_F (209)
TrxA_1 (3)	TAGGAGCGCCATATGAG TGCTACCCCTCAAGTTTC C	Amplifica un fragmento de 511 pb junto a TrxA_2 (4). Utilizado para comprobar el grado de segregación en el gen <i>trxA</i> .
TrxA_2 (4)	AAACCCCGGAAGTGAT TGCGAATTAG	Amplifica un fragmento de 511 pb junto a TrxA_1 (3). Utilizado para comprobar el grado de segregación en el gen <i>trxA</i> .

2.1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo y sus características más relevantes se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia	Referencia
pBSII-KS(+)	Vector de clonación. Contiene el fragmento α de la β -galactosidasa que permite la selección de los clones que llevan el inserto.	Ap	Stratagene
pglnN_ParsB_natR	Derivado del plásmido pBSII-KS(+). Contiene el promotor <i>P_{arsB}</i> y el gen <i>glnN</i> interrumpido con el gen de resistencia a nourseotricina.	Nat	Colección del laboratorio



MATERIALES Y MÉTODOS

pGQ5.4+	Derivada del plásmido pGEMT. Contiene un fragmento de 564 pb aguas arriba del gen <i>trxA</i> , incluyendo 27 pb del mismo, y un fragmento de 780 pb aguas abajo de <i>trxA</i> . Una diana <i>Bam</i> HI permite insertar el gen de resistencia a espectinomicina en la misma orientación de <i>trxA</i> .	Sp, St	Colección del laboratorio
pnrsD_PcpcB_Kmv3R	Derivado del plásmido pBSII-KS(+). Contiene el promotor <i>P_{cpcB}</i> y el gen <i>nrsD</i> interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina.	Km	Colección del laboratorio
p28AnNTR2	Contiene el gen <i>all0737</i> de <i>Anabaena</i> y las dianas de restricción <i>Nde</i> I y <i>Not</i> I.	Km	Colección del laboratorio

Los plásmidos construidos en este trabajo con ADN procedente de *Synechocystis* y sus características más relevantes se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Resistencia
pBS-TRXA2	Derivado del plásmido pglN_N_ParsB_natR. Contiene el gen <i>trxA</i> insertado con las enzimas de restricción <i>Nde</i> I y <i>Not</i> I.	Nat
pBS-TRXA3	Derivado del plásmido pglN_N_ParsB_natR. Contiene el gen <i>trxA</i> obtenido mediante PCR solapante con los pares de oligonucleótidos ParsB_EcoRI_F y PArsB_TrxA_5'_R, y PArsB_TrxA_5'_F y TrxA_3'_R, e insertado con las enzimas de restricción <i>Eco</i> RI y <i>Not</i> I.	Nat
pBS-NTRC	Derivado del plásmido pnrsD_PcpcB_Kmv3R. Contiene el gen <i>all0737</i> de <i>Anabaena</i> obtenido a partir del plásmido p28AnNTR2, e insertado con las enzimas de restricción <i>Nde</i> I y <i>Not</i> I.	Km

2.2 Aislamiento y manipulación de ADN

2.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

El aislamiento de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina descrito por Sambrook (Sambrook et al., 1989). Las células se sometieron a lisis alcalina en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y NaOH. Posteriormente, se eliminaron las proteínas y el ADN cromosómico mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. El ADN plasmídico se precipitó con etanol absoluto y se resuspendió posteriormente en agua miliQ. Cuando se deseaba eliminar el contenido



MATERIALES Y MÉTODOS

en ARN se realizaba un tratamiento de 1 hora a 37°C con RNAsa A de páncreas bovino de Sigma Aldrich a una concentración final de 20 µg/ml.

Para el aislamiento de ADN plasmídico de alta calidad para la transformación de *E. coli* o para su secuenciación, se utilizaron sistemas comerciales como GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Aislamiento de ADN genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803

El aislamiento de ADN total de *Synechocystis* se realizó mediante el método descrito por Cai y Wolk (Cai y Wolk, 1990) basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Las células procedentes de 50 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (4.500 rpm, 4°C y 10 minutos) y se resuspendieron en 400 µl de tampón T.1E 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8). A la suspensión celular se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio de Retsch (0.1-0.25 mm de diámetro) estériles, 20 µl de SDS al 10% (p/v) y 400 µl de una mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La suspensión se sometió a 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa y 1 minuto de incubación en hielo. Posteriormente, las preparaciones se centrifugaron (12.000 rpm, 4°C y 15 minutos) para eliminar restos celulares y las perlas de vidrio. El sobrenadante se sometió a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Por último, el ADN se precipitaba en frío (-20°C) con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y en presencia de acetato sódico 3M (pH 5.2). Tras una centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de tampón T.1E 1X. Para eliminar el ARN presente en las muestras, se trataron con RNAsa A de páncreas bovino de Sigma Aldrich (20 µg/ml) durante 1 hora a 37°C.

2.3 Introducción de ADN exógeno en organismos

2.3.1. Transformación de células de *E. coli*

Las células competentes de la estirpe de *E. coli* las suministró el servicio de cultivos biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Para transformar las células competentes de la estirpe DH5α de *E. coli*, el ADN transformante (20 µl de volumen máximo) se mezcló con una alícuota de 100 µl descongelada en hielo. Tras incubar 30 minutos en hielo, la mezcla se sometió a choque térmico durante 2 minutos a 42°C seguidos de 1 minuto en hielo. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio LB a la mezcla y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Las células se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de los transformantes. Finalmente, las placas se recogieron tras 14-16 horas de incubación a 37 °C. Cuando se utilizaron plásmidos para la identificación de clones portadores de moléculas recombinantes debido a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio



se suplementó con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,2 mM y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal) 40 μ g/ml. Las colonias que presentaban color blanco contenían los plásmidos recombinantes.

2.3.2. Transformación de células de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis presenta un sistema natural mediante el cual es capaz de incorporar en el interior celular moléculas de ADN que se encuentran en el medio de cultivo (Grigorieva y Shestakov, 1982). Si este ADN incorporado presenta similitud con alguna secuencia del genoma se integrará por un proceso de recombinación homóloga. El método de transformación de *Synechocystis* se basa en el método descrito por Chauvat (Chauvat et al., 1986).

Las células se cultivaron en matraces de 250 ml (50 ml de células) y se les renovó el medio BG11C durante 3 días (1 vez al día), para mantener el cultivo en fase exponencial de crecimiento. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{750nm} de 0.1-0.3, las células se recogieron por centrifugación (4.500 rpm, 10 minutos) y se lavaron 2 veces con medio BG11C nuevo para eliminar posibles nucleasas extracelulares. Posteriormente, las células se resuspendieron en 1 ml de medio BG11C nuevo y se repartió en tubos de poliestireno-cristal de 10 ml de Soria Greiner S.A. (en 200 μ l por tubo), junto con 2 μ g de ADN purificado.

La mezcla de células y ADN se incubó durante 2-3 horas en condiciones estándar de crecimiento (30°C y 50 μ E m⁻²s⁻¹ de luz). Tras la incubación, las células se sembraron en placas de Petri con medio BG11C sólido sin antibióticos, sobre filtros IMMOBILON-NC 85 mm de Whatman™ Millipore. Tras 20 horas en condiciones estándar de crecimiento, los filtros se transfirieron a placas de Petri con medio BG11C sólido y el antibiótico adecuado en cada caso para la selección de los transformantes. Las colonias transformadas y resistentes al antibiótico aparecían aproximadamente a los 7-10 días de incubación. Las réplicas posteriores, con el aumento de la concentración del antibiótico, permitían conseguir la segregación de las copias cromosómicas mutantes.

2.4 Análisis y cuantificación del ADN

2.4.1. Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN, plasmídico o fragmentos amplificados por PCR, se determinaron mediante un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 siguiendo las instrucciones del fabricante.



2.4.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para separar fragmentos de ADN se realizó el método descrito por Sambrook (Sambrook et al., 1989), utilizando geles de agarosa al 0.75-1.20 % (p/v) preparados en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM y pH 8) y añadiendo bromuro de etidio a una concentración final de 1 µg/ml. A las muestras de ADN se les añadió 1/10 del volumen de tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25% (p/v), xileno-cianol FF al 0.25 % (p/v) y glicerol al 50% (v/v) en agua destilada). Para determinar el tamaño del ADN, se utilizó el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen.

La electroforesis se realizó en aparatos Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad y la visualización del ADN se realizó en un transiluminador Universal Hood II de Bio-Rad con luz ultravioleta (302 nm) y un sistema Gel-Doc™ XR también de Bio-Rad. Los geles se fotografiaron con un equipo Digital Graphic Printer UP D-897 de Sony.

2.4.3. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para la purificación de los fragmentos de ADN desde los geles de agarosa, se recortaron y se sometieron a un proceso de extracción mediante un sistema comercial denominado FavorPrep™ MicroElute GEL Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.4. Manipulación enzimática de ADN

La manipulación enzimática del ADN se realizó según el método descrito por Sambrook (Sambrook et al., 1989) y utilizando endonucleasas de restricción suministradas por Takara.

La desfosforilación de los extremos de vectores abiertos con enzimas de restricción para evitar posibles religaciones, se realizaron con fosfatasa alcalina (Roche). Para ello, la muestra en presencia de la fosfatasa alcalina y en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM, se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente, los fragmentos de ADN se purificaron (ver detalles en el apartado III.2.4.3).

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron mediante el uso de la ligasa de ADN del fago T4 de Promega. Todos los tratamientos se realizaron según las instrucciones del fabricante.

2.4.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T-Personal 48 de Biometra y utilizando un volumen de 25 ó 50 µl. Cada reacción contenía 2.5 U o 5 U de



MATERIALES Y MÉTODOS

DreamTaq DNA polimerasa de ThermoFisher Scientific, tampón DreamTaq 1X (suministrado con la enzima), $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs a concentración final de 0.2 mM cada uno, 1.5 ng de ADN molde y 50 pmol de cada oligonucleótido específico para amplificar el fragmento de ADN requerido.

El programa de amplificación consistió típicamente en un primer ciclo de desnaturalización (95°C, 5 minutos), seguido de 30-35 ciclos de reacción y un ciclo final de polimerización (72°C, 5 minutos). Los ciclos de reacción constaban de una etapa inicial de desnaturalización (95°C, 1 minuto), una etapa de renaturalización (temperatura dependiente de los oligonucleótidos y 1 minuto) y una etapa de polimerización (72°C y 1 minuto por cada kilobase a amplificar).

Los fragmentos de ADN amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron como se ha descrito anteriormente (ver detalles en los apartados III.2.4.2 y III.2.4.3).

2.4.6. PCR solapante

Esta técnica consiste en el diseño de dos parejas de oligonucleótidos que amplifican dos regiones que solapan entre sí aproximadamente unos 20 pb. Inicialmente se realizan dos PCRs estándar donde se obtienen dos fragmentos de ADN que contienen un extremo solapante. La amplificación posterior utilizando como molde los dos fragmentos generados en la PCR previa y los cebadores de los extremos no solapantes, da lugar al fragmento completo. Este fragmento es el que se introduce en un vector de clonación posteriormente.

El programa de amplificación consistió en un primer ciclo de desnaturalización (95°C, 5 minutos), seguido de una bajada gradual de la temperatura a 0.03°C/s hasta alcanzar 37°C. Posteriormente se realizó una etapa de extensión (72°C, 10 minutos), y finalmente una etapa de amplificación, añadiendo los oligonucleótidos específicos de ambos extremos del fragmento a amplificar y utilizando el programa de PCR estándar.

2.4.7. Secuenciación de ADN

La comprobación de las secuencias de ADN se realizó mediante secuenciación automática en el servicio de secuenciación comercial de Stab Vida (Portugal).

2.5 Análisis y cuantificación del ARN

2.5.1. Tratamiento del material

El material utilizado durante la extracción de ARN se sometió a un tratamiento para evitar la posible degradación del ARN debido a la presencia de RNAsas. Las soluciones utilizadas se prepararon con agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC)



(agua MilliQ sometida a 0.1% de DEPC durante 16 horas a 37°C). Para la inactivación del DEPC, las soluciones se autoclavarón.

El material de vidrio utilizado se esterilizó por calentamiento en un horno JP de Selecta (200°C, 2 horas) o mediante el tratamiento con H₂O₂ (33% v/v, 10 minutos). Por otro lado, el material de plástico se esterilizó mediante el autoclavado. Todos los productos comerciales utilizados son libres de RNAsas.

2.5.2. Aislamiento de ARN total

Para el aislamiento del ARN total de *Synechocystis* se utilizó el método desarrollado por García-Domínguez y Florencio (García-Domínguez y Florencio, 1997). Se recogieron 10⁷ células aproximadamente (fase exponencial de crecimiento) por centrifugación (9.000 rpm, 5 minutos y 4°C) y se resuspendieron en 400 µl de tampón STET (NaCl 0.1 M, Triton X-100 al 5% (v/v), EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8). Para la rotura de las células se añadió perlas de vidrio de 0.45-0.6 mm de diámetro de Sigma Aldrich (volumen equivalente a 150 µl), tratadas previamente con agua regia y horneadas, y 400 µl de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Tras 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa y 1 minuto de incubación en hielo, la mezcla se centrifugó (13.000 rpm, 15 minutos y 4°C) y el sobrenadante se trató al menos tres veces con una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) para eliminar las proteínas de la muestra. Los ácidos nucleicos se precipitaron con cloruro de litio 0.5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche. Para eliminar el ADN, las muestras se incubaron con DNAsa libre de RNAsa de Roche y se añadió nuevamente fenol:cloroformo 1:1 (v/v) para eliminar la enzima. Finalmente, el ARN se precipitó con acetato de sodio 0.1 M y etanol absoluto, y se resuspendió en 30 µl de H₂O tratada con DEPC.

2.5.3. Cuantificación de ARN aislado

Para determinar la concentración de ARN de las muestras obtenidas se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.4. Electroforesis de ARN

El ARN aislado de *Synechocystis* se sometió a un proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), preparado previamente en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 20 mM, pH 7, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM) y en presencia de bromuro de etidio (1 µg/ml) y formaldehído 6.5%.

Las muestras de ARN, 10-15 µg de ARN, se mezclaron con 5% de tampón MOPS 10X, 18 % de formaldehído al 37% (v/v) y 50% de formamida desionizada, en un



MATERIALES Y MÉTODOS

volumen total de 27 µl. Posteriormente se incubaron durante a 65°C durante 15 minutos para desnaturalizar el ARN y se añadió 3 µl de tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), xileno-cianol FF al 0.25 % (p/v) y glicerol al 50% (v/v) en agua destilada). La electroforesis se realizó a 90V durante 35-40 min y en tampón MOPS 1X.

2.5.5. Detección del ARNm mediante hibridación ARN-ADN (Northern blot)

Una vez finalizada la electroforesis de ARN, el gel se lavó tres veces durante 15 minutos, en agitación suave y con agua tratada con DEPC. Posteriormente se equilibró dos veces con SSPE 10X (1.5 M NaCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM EDTA) durante 20 minutos y en agitación suave también.

El gel con las muestras de ARN se transfirió a membranas Immobilon-NY+ de Millipore mediante un aparato de transferencia por vacío Mini Horizontal Submarine Unit de Hoefer Scientific Instruments y con la presencia de tampón SSPE 10X. Tras finalizar la transferencia, el filtro se horneó durante 2 horas a 70°C. Posteriormente, los filtros se prehibridaron con una solución de hibridación (fosfato sódico 0.5 M, pH 7.2, EDTA 10 mM y SDS 7% (p/v)) durante 30 minutos a 65°C, seguidos por una incubación de 15-20 horas con las sondas radiactivas deseadas. En este trabajo se han utilizado las sondas *trxA* y *mpB*, procedentes de la colección del grupo. Tras finalizar la incubación, el filtro se lavó durante 40 minutos a temperatura ambiente y 40 minutos a 65°C con solución de lavado (fosfato sódico 40 mM, pH 7.2 y SDS 1% (p/v)).

El uso de pantallas de autorradiografía y un escáner Cyclone Storage Phosphor System permitió detectar la señal radiactiva. Para normalizar los resultados obtenidos se utilizó como control de carga una sonda del gen *mpB*, que codifica la subunidad de ARN de la RNAsa P de *Synechocystis*, que se expresa de manera constitutiva en las condiciones de experimentación (Vioque, 1992).

2.5.6. Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq)

Para la secuenciación del ARN se utilizaron las muestras de ARN purificado conforme se describe en el apartado 2.5.2. La calidad de las muestras de ARN a través del cálculo del algoritmo *RNA Integrity Number* o RIN se analizó con el equipo Bioanalyzer Agilent 2100 del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Para eliminar el ARN ribosómico se utilizó el kit Ribo-Zero Magnetic para bacterias (Illumina), realizado por el personal de StabVida (Lisboa, Portugal). La secuenciación también se realizó por el personal de StabVida utilizando un secuenciador Illumina HiSeq 4000 utilizando lecturas pareadas o *paired-end* de 150 pares de bases, y siguiendo las instrucciones del fabricante.



3. Métodos de Bioquímica

3.1 Preparación de extractos celulares

3.1.1. Rotura con perlas de vidrio

El método de rotura con perlas de vidrio se utilizó para la obtención de extractos celulares. La centrifugación de diferentes volúmenes de cultivo en tubos de 1.5, 2.0, 15 o 50 ml permitió obtener un precipitado celular que se resuspendió en un volumen de 50-200 μ l de tampón adecuado (Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 50 mM y SDS 2%), y con una cantidad equivalente a 50 μ l de perlas de vidrio de Retsch (0.1-0.25 mm de diámetro) por cada 100 μ l de muestra. Inmediatamente después se añadió un inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 1 mM de concentración final. Las células se sometieron a 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa y 1 minuto en hielo, para finalmente separar los restos celulares, las perlas de vidrio y la fracción soluble mediante centrifugación (13.000 rpm, 15 minutos y 4°C). El sobrenadante resultante constituyó el extracto crudo libre de células.

3.1.2. Rotura por ultrasonidos

El procedimiento de rotura por ultrasonidos se realizó en *Synechocystis*. Los cultivos se recogieron y se les añadió H₂O miliQ en una proporción de 1 ml por cada 8 mg·ml⁻¹ de clorofila. Finalmente se sometieron a 2 ciclos de 60 segundos de ultrasonido (75W) y 30 segundos en hielo. El sonicador utilizado es el modelo S450D de Branson, con una frecuencia de 20 KHz. La suspensión celular se centrifugó (18.000 rpm, 15 minutos y 4°C), siendo el sobrenadante el extracto libre de células.

3.1.3. Rotura con ácido tricloroacético (TCA)

El procedimiento de rotura con TCA permite obtener extractos celulares evitando la oxidación de las proteínas producido durante el proceso de centrifugación y/o durante el proceso de rotura con perlas de vidrio. Para ello, las células de *Synechocystis* cultivadas en condiciones estándar de crecimiento se recogieron e incubaron inmediatamente con TCA a una concentración del 10% final (v/v) durante 30 minutos en hielo. Las células se centrifugaron (15.000 rpm, 15 minutos y 4°C) y se sometieron a 3 lavados sucesivos con 1 ml de acetona 100% fría, para eliminar el TCA restante en las muestras. Finalmente, los extractos celulares se dejaron secar al aire, se resuspendieron en el tampón adecuado y se centrifugaron (15.000 rpm, 15 minutos y 4°C) una última vez para retirar los restos celulares no solubles.



3.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando dos métodos diferentes:

- Método descrito por Bradford (Bradford, 1976), utilizando para ello el reactivo suministrado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Método descrito por Lowry (Lowry et al., 1951) y modificado por Markwell (Markwell et al., 1978), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se ha utilizado para cuantificar las proteínas totales de células enteras.

En ambos casos, para la curva patrón se utilizaron cantidades conocidas y crecientes de albúmina de suero bovino (BSA) de Sigma Aldrich.

3.3 Electroforesis de proteínas

3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes basados en el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970) y descrito por Sambrook (Sambrook et al., 1989), utilizando aparatos Mini-Protean 3 Cell o Tetra Cell de Bio-Rad.

Los geles de poliacrilamida presentan un gel de concentración (parte superior) y un gel de separación (parte inferior). Los geles de separación se prepararon en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8.8) y la concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) varió entre el 7.5 y el 15% (p/v) según el peso molecular de las proteínas a analizar. Los geles de concentración se prepararon en Tris-HCl 125 mM (pH 6.8) y una concentración de poliacrilamida del 4% (p/v). En ambos casos, se añadió dodecil sulfato sódico (SDS) al 0.1% (p/v) y como catalizador de la reacción se utilizó persulfato amónico (APS) al 0,7% y N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamida (TEMED) al 0,1%.

Las muestras se mezclaron con el tampón de carga de proteínas 1X (Tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6.8), glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v) y azul de bromofenol al 0.0025% (p/v)). Para el análisis de proteínas de membrana, el tampón utilizado contiene HEPES-NaOH 25 mM (pH 7.0), CaCl₂ 15 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 15% (v/v). Cuando las proteínas se separaron en condiciones reductoras, se mezclaron con el tampón anterior que contenía 2-mercaptoetanol 10% (v/v) o DTT 100 mM. En todos los casos, las muestras se desnaturizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

En el caso de proteínas con peso molecular inferior a 12 kDa, se realizó según el método descrito por Schagger y Jagow (Schagger et al., 1987). Para ello, se utilizaron geles de concentración con un 6% de poliacrilamida y geles de separación con un 15% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 48:1.5). Los geles contenían Tris-HCl 1 M (pH 8.45), SDS 0.1% (p/v) y la presencia de glicerol al 16.7% en los geles de separación.



El desarrollo de la electroforesis se realizó a temperatura ambiente, 150 o 200V y una duración determinada en función del peso molecular de las proteínas a separar.

3.3.2. Electroforesis en condiciones nativas (Blue Native)

Las células se recogieron por centrifugación (15.000 rpm, 8 minutos y 4°C) y se lavaron dos veces con un tampón de lavado que contiene HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.5) y CaCl₂ (30 mM). Posteriormente, las células se rompieron en presencia de perlas de vidrio de Retsch (0.1-0.25 mm de diámetro) y por agitación en vórtex. El tampón de rotura contiene HEPES-NaOH 50 mM (pH 7.5), CaCl₂ 30 mM, sorbitol 800 mM y ácido ϵ -amino-n-caproico 1 mM. Las células rotas y las perlas de vidrio se retiraron por centrifugación (3.000 rpm, 8 minutos y 4°C). Una nueva centrifugación (15.000 rpm, 20 minutos y 4°C) permitió separar las membranas de las proteínas solubles, que correspondían con el precipitado y el sobrenadante respectivamente.

Las membranas celulares se resuspendieron cuidadosamente en 10 μ l de tampón de resuspensión BisTris 25 mM (pH 7), glicerol 20%, MgCl₂ 500 mM y Pefabloc 5mg/ml. Posteriormente se incubaron durante 10 minutos en hielo, se añadió 10 μ l del tampón de resuspensión con β -dodecil-Imaltosido (DDM) 1% p/v final, y finalmente se incubaron de nuevo 10 minutos en hielo. Finalmente, una centrifugación (15.000 rpm, 20 minutos y 4°C) permitió obtener las membranas celulares solubilizadas en el sobrenadante a las que se les añadió 5 μ l del tampón de carga que contiene Bis-Tris 100 mM, ácido ϵ -amino-n-caproico 500 mM, sacarosa 37.5% y Serva G Blue 50 mg/ml antes de realizar la electroforesis nativa.

Los geles nativos se prepararon según el método descrito por Schamel (Schamel, 2008), con algunas modificaciones. Los componentes de los geles de acrilamida se preparan siguiendo un orden como se detalla en la tabla 10. Las soluciones stock contienen: Tampón BN 3X (BisTris 150 mM, ácido 6-aminohexanoico 1.5 M), glicerol 70% (p/v), acrilamida (48% p/v acrilamida y bisacrilamida 1.5%), TEMED y persulfato de amonio (APS) 10% p/v. Para la electroforesis se utilizó un tampón para el cátodo con BisTris 15 mM (pH 7), Tricina 50 mM y 0.005% p/v de azul de Coomassie G250, y un tampón para el ánodo con BisTris 50 mM (pH 7). El desarrollo de la electroforesis se realizó a una temperatura de 4°C, y siguiendo un voltaje de 50V (30 minutos), 75V (30 minutos), 100V (60 minutos), 125V (30 minutos), 150V (60 minutos), 175V (60 minutos) y 200V (60 minutos). Después de 90 minutos de electroforesis, el tampón del cátodo se reemplazó por un tampón nuevo y con la misma composición, pero sin azul de Coomassie.



Tabla 10. Composición del gel de acrilamida en gradiente.

Soluciones stock	Gel 1 (µl)	Gel 2 (µl)	Gel 3 (µl)
H ₂ O miliQ	1077.4	420	121
Tampón BN (3X)	700	700	500
Glicerol 75% (p/v)	140	560	-
Solución acrilamida	169.6	407	121
TEMED	11	11	16
APS 10% (p/v)	2	2	3

3.4 Tinción de proteínas

3.4.1. Tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB)

Los geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de azul de Coomassie (Brilliant Blue R-250 de Sigma Aldrich 0.1% (p/v), ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v)) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente, los geles de poliacrilamida se lavaron con una solución desteñidora (metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) hasta la correcta visualización de las proteínas como bandas de color azul.

3.5 Inmunodetección de proteínas en membrana (Western blot)

Para los ensayos de Western blot las proteínas una vez separadas mediante electroforesis (ver detalles en el apartado 3.3.1), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium 0.45 µm de Bio-Rad. Para ello se utilizó un sistema de transferencia tipo semiseco TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit de GE Healthcare y se siguieron las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante 60 minutos, a temperatura ambiente y una intensidad de 0.8 mA·cm⁻² por cada gel, manteniendo un voltaje máximo de 20V. Los geles de poliacrilamida y las membranas de nitrocelulosa se humedecieron en tampón de transferencia (Tris-HCl 49.4 mM pH 8.3, glicina 39 mM, SDS 1.3 mM y metanol 20% (v/v)).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se incubaron con una solución bloqueante (caseína de leche bovina de Sigma Aldrich 5% (p/v) y Tween-20 0.1% (v/v) en tampón PBS (NaCl 26 mM, KCl 0.54 mM, Na₂HPO₄ 0.8 mM, KH₂PO₄ 0.352 mM)), durante 1 hora, temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución bloqueante (Tabla 10), durante 14-16 horas, temperatura de 4°C y en agitación suave. A continuación, las membranas se lavaron 4 veces, 40 minutos en total, con una solución de lavado (PBS 1X y Tween-20 0.1% (v/v)) y en agitación suave. Una vez finalizados los lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-



MATERIALES Y MÉTODOS

inmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de Sigma Aldrich diluido en solución bloqueante (1:20.000), durante 1 hora y en agitación suave. Finalmente, se repitió el proceso de lavado descrito anteriormente.

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Dilución utilizada	Anticuerpo	Dilución utilizada
α -TrxA	1:3000	α -CP47	1:10000
α -TrxB	1:2000	α -PsaB	1:10000
α -TrxQ	1:1000	α -PsaC	1:10000
α -GrxA	1:2000	α -CF1	1:10000
α -GrxC	1:3000	α -PetA	1:10000
α -2CysPrx	1:3000	α -PC	1:5000
α -GSI	1:1000000	α -RbcL	1:15000
α -D1	1:10000	α -FBPasa	1:15000
α -FurA	1:3000	α -SBP/FBPasa	1:15000
α -FNR	1:10000		

El proceso de revelado de la actividad peroxidasa se utilizó el sistema comercial Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6 Alquilación de proteínas

Para estudiar el estado *redox* de las proteínas se realizaron experimentos de marcaje con agentes alquilantes que se unen a las cisteínas reducidas. En el caso de proteínas de pequeño tamaño (\approx 15-20 kDa) se utilizó el agente alquilante ácido 4-acetamido-4'-maleimidilstilbeno-2,2'-disulfónico (AMS) que se une a las cisteínas reducidas y aumenta la masa molecular en 0.5 kDa. En el caso de los ensayos a partir de extractos celulares, estos se obtuvieron según el apartado 3.1.1, y se dividieron en ocho fracciones. Dos de ellas se trataron con un agente reductor, 50 mM de DTT, otras dos se trataron con CuCl_2 (100 μM), otras dos con H_2O_2 (5 mM) y dos no se trataron con ningún agente. Todas las fracciones se incubaron durante 1 hora en hielo. Posteriormente, se añadió TCA 10% (v/v) y se incubó durante 1 hora en hielo de nuevo. La centrifugación posterior (12.000 rpm, 10 minutos y 4°C) permitió obtener un precipitado donde se encuentran las proteínas. Para eliminar posibles restos de TCA se realizaron tres lavados con 1 ml de acetona fría sin resuspender el precipitado. Finalmente, el precipitado se resuspendió en un tampón que contiene Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 7.5% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v). La mitad de las



MATERIALES Y MÉTODOS

muestras se trataron con AMS 10 mM, incorporado en el tampón de resuspensión. Después de una hora de incubación, las muestras se sometieron a una electroforesis en geles SDS-PAGE (ver detalles en el apartado III.3.3.1).

En el caso de los ensayos *in vivo* de proteínas de peso molecular pequeño (≈ 15 -20 kDa), se añadió TCA al cultivo inmediatamente antes de recoger las células y se incubaron durante 1 hora en hielo. El TCA, además de precipitar las proteínas, también rompe las células. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (13.000 rpm, 10 minutos y 4°C) y se lavaron tres veces con 1 ml de acetona fría. Finalmente, el precipitado se resuspendió en el mismo tampón anteriormente comentado (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 7.5% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) y en presencia de AMS 10 mM. Después de una hora de incubación, las muestras también se sometieron a una electroforesis en geles SDS-PAGE (ver detalles en el apartado III.3.3.1).

En el caso de los ensayos *in vivo* de proteínas de peso molecular intermedio (≈ 35 -55 kDa), se utilizaron dos agentes alquilantes. Inmediatamente antes de recoger las células, se trataron con N-etilmaleimida (NEM) 10 mM que se une y bloquea los grupos tiol reducidos. Este compuesto aumenta la masa molecular 0.125 kDa por cada cisteína reducida. Posteriormente, las células se centrifugaron (13.000 rpm, 10 minutos y 4°C), se resuspendieron en tampón que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 50 mM y NEM 100 mM, y se rompieron con perlas de vidrio en agitación con vórtex como se describe en el apartado 3.1.1. Una centrifugación posterior (13.000 rpm, 10 minutos y 4°C) permitió eliminar las perlas de vidrio y los restos celulares. El sobrenadante, que contiene las proteínas, se transfirió a un tubo nuevo y se incubó con TCA 10% durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (13.000 rpm, 10 minutos y 4°C) y el precipitado, que contiene las proteínas, se lavó tres veces con 1 ml de acetona fría. El precipitado resultante se resuspendió con un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 50 mM y SDS 2%, y se separó en tres fracciones. Dos de las fracciones se trataron con DTT 100 mM durante 60 minutos en hielo, se añadió la misma cantidad de H₂O miliQ a la tercera fracción. Finalmente, las tres fracciones se trataron con TCA 10% y acetona fría para eliminar el DTT, y se resuspendieron en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7), SDS 2%, glicerol 7.5%, azul de bromofenol 0.01%. Al tampón utilizado para resuspender una de las dos fracciones tratadas previamente con DTT, se le añadió también el agente alquilante Metil-PEG-Maleimida (MM(PEG₂₄)). Este agente alquilante aumenta el peso molecular en 1.24 kDa por grupo tiol reducido.



3.7 Determinación de nucleótidos de adenina

Para cuantificar los nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) en *Synechocystis*, se recogieron 10^8 células mediante centrifugación (4.500 rpm, 4°C y 10 minutos), y se resuspendieron en frío (4°C) en 225 μ l de ácido perclórico (HClO_4) 0.33 M, homogenizándose mediante vortex (5 segundos). Las muestras se incubaron durante 5 minutos en hielo, se centrifugaron (13.000 rpm, 4°C y 10 minutos) y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se neutralizó con 25 μ l de KOH 2.5 M en tampón MES 0.5 M, centrifugándose de nuevo (13.000 rpm, 4°C y 10 minutos) y recuperándose 160 μ l. Estas muestras neutralizadas se filtraron mediante una columna Amicon® Ultra 0.5 ml Centrifugal Filters de Millipore (13.0000 rpm, 4°C y 30 minutos). La separación de los metabolitos se llevó a cabo utilizando un HPLC de Supelco conectado al sistema HPLC Hitachi ELITE LaChrom System y con una columna SUPELCOSIL™ LC-18-T. Los metabolitos se detectaron y analizaron utilizando una lámpara de deuterio de Hitachi a 254 nm y con un detector de matriz de diodos L-2455.

3.8 Determinación de aminoácidos

La cuantificación de los aminoácidos libres en las muestras se realizaron mediante HPLC de fase reversa tras derivatización con el reactivo fenilisotiocianato y utilizando una columna LiChrosper 100-RP-18 (5 μ m) de Merck (Heinrikson y Meredith, 1984).

3.9 Marcaje de proteínas *in vivo* con ^{35}S -Met/Cys

Las células de un cultivo en condiciones estándar de crecimiento se recogieron en diferentes tiempos y se utilizaron para realizar un marcaje con metionina y cisteína marcada con ^{35}S (^{35}S -Met/Cys) de American Radiolabeled Chemicals. Para ello, se añadió 205 μ l de ^{35}S - Met/Cys (10 μ Ci final) en un volumen de cultivo de 1 ml. La mezcla se volvió a colocar en las mismas condiciones de crecimiento durante 10, 20, 30 o 60 minutos según el experimento.

Una vez transcurrido el tiempo, la mezcla se dividió en dos tubos eppendorf (0.5 ml cada uno). Uno de ellos se utilizó para cuantificar la incorporación de ^{35}S -Met/Cys al interior celular y el otro para cuantificar la incorporación de ^{35}S -Met/Cys en proteínas.

Por un lado, se añadió 0.5 ml de medio BG11C con metionina fría (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) al tubo utilizado para cuantificar la incorporación de ^{35}S -Met/Cys a la célula. Posteriormente, esta mezcla se filtró con un equipo de filtración al vacío sobre un filtro de vidrio, se lavó 3 veces con 5 ml de BG11C y la señal sobre el filtro se cuantificó con un contador de centelleo líquido LS 6000 IC (Beckman).



Para la cuantificación de ^{35}S -Met/Cys en proteínas se añadió 0.5 ml de una mezcla de TCA 20% y SDS 2% sobre el otro tubo y se incubó durante 1 hora en hielo. La mezcla se filtró, se lavó 2 veces con 4 ml de TCA 10% y 1 vez con 4 ml de acetona fría 100%, y la señal sobre el filtro se cuantificó con el contador de centelleo comentado anteriormente.

4. Métodos de Biofísica

4.1 Fluorescencia de la clorofila a: Actividad del PSII

Las medidas de la fluorescencia de la clorofila utilizando células intactas de *Synechocystis* se realizaron con un fluorómetro con pulsos de amplitud modulada (Dual-PAM-100; Walz). Para realizar las medidas se utilizaron de las diferentes estirpes la misma concentración celular ($2 \cdot 10^7$ células·ml $^{-1}$) o la misma concentración de clorofila ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), según el experimento realizado. Las suspensiones celulares se adaptaron a un periodo de oscuridad de 15 minutos y las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

4.1.1. Curva de inducción-recuperación

Las cinéticas de inducción-recuperación permiten obtener una serie de parámetros relacionados con el estado del aparato fotosintético y el flujo de electrones fotosintéticos. Inicialmente y una vez finalizado el periodo de oscuridad (15 minutos), se obtiene el parámetro F_0 , definido como fluorescencia mínima de la clorofila a en estado adaptado a oscuridad. Para el cálculo del F_0 se utiliza una luz no actínica (630 nm , $0.1 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 11). Posteriormente si se aplica un pulso saturante de 635 nm , $10.000 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y una duración de 100 ms , se obtiene el parámetro F_{md} , definido como fluorescencia máxima de la clorofila a en estado adaptado a oscuridad (Figura 11).

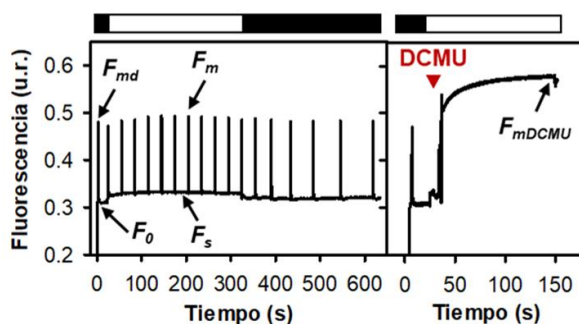


Figura 11. Fluorescencia de la clorofila a. Los detalles de la cinética inducción-reducción para obtener los parámetros F_0 , F_{md} , F_m y F_s , y los detalles de la cinética inducción con DCMU para obtener el parámetro F_{mDCMU} se describen en el texto.



La aplicación de una luz actínica roja (620 nm), con una intensidad y duración variable según el experimento realizado, permite obtener el parámetro F_s , definido como fluorescencia basal de la clorofila *a* durante la iluminación actínica (Figura 11). La aplicación posterior de pulsos saturantes durante la iluminación con luz actínica roja, permiten obtener el parámetro F_m , definido como fluorescencia máxima de la clorofila *a* en estado adaptado a luz actínica roja. La intensidad de la luz actínica y la duración varía según en el experimento realizado. Finalmente, la aplicación a la suspensión celular de 20 μM de DCMU en presencia de luz actínica de 100 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, permite obtener el parámetro F_{mDCMU} (Figura 11), definido como fluorescencia máxima de la clorofila *a* y donde la quinona (Q_A) permanece completamente reducida.

Los parámetros comentados anteriormente permiten obtener la fluorescencia variable en luz como $F_q=(F_m-F_s)$, parámetro relacionado con el porcentaje de centros de reacción abiertos en condiciones de luz actínica, y el rendimiento efectivo del PSII o eficiencia fotoquímica como $Y(II)=(F_m-F_s)/F_m$. También es posible obtener la fluorescencia variable en oscuridad como $F_v=(F_m-F_0)$ y el rendimiento fotoquímico máximo como $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$, parámetros relacionados con el estado del *pool* de plastoquinona en oscuridad.

Otro parámetro que es posible obtener es el NPQ_{luz} , definido por $((F_{mDCMU}-F_m)/F_{mDCMU})$ indica la fracción de Q_A que no se ha reducido durante la iluminación actínica, y está asociada a la activación de mecanismos fotoprotectores para disipar el exceso de energía en las condiciones ensayadas. En paralelo, también es posible determinar el parámetro NPQ_{osc} como la diferencia entre F_{md} y F_{mDCMU} $((F_{mDCMU}-F_m)/F_{mDCMU})$ y que refleja el estado de oxidación de Q_A en oscuridad. Este parámetro está directamente relacionado con los estados de transición en las cianobacterias y el reparto energético que se establece entre los fotosistemas I y II.

Las cinéticas inducción-recuperación de manera general se llevaron a cabo con una duración de 620 s (20 s de oscuridad, 300 s de luz actínica y 300 s de oscuridad de nuevo) (Figura 11).

4.1.2. Fluorescencia post-iluminatoria

Las suspensiones celulares adaptadas a oscuridad (15 minutos), se sometieron a un periodo de 30 s o 300 s de luz actínica (620 nm, 50 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), tras este periodo se apagó la luz y se midió la fluorescencia post-iluminatoria. El incremento transitorio detectado debido a la fluorescencia de la clorofila *a* tras iluminación depende de la reducción de Q_A debido al retorno de electrones procedentes del PSI o de azúcares reducidos vía NDH-1 o SDH (Munekage et al., 2004; Shikanai et al., 1998). Cuando se



utilizó glicolaldehído (GA, 10 mM), un inhibidor del ciclo de CBB, este se añadió inmediatamente antes de la adaptación de los cultivos a los 15 minutos de oscuridad.

4.1.3. Estados de transición

Para realizar un seguimiento de los estados de transición, definidos en la Introducción, las suspensiones celulares adaptadas a oscuridad se iluminaron inicialmente con luz actínica azul (460 nm, 40 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para inducir la transición del estado I. Después de 150 s, el cambio a luz actínica roja (620 nm, 40 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) induce la transición al estado II. Finalmente, y después de 300 s, el cambio de nuevo a luz actínica azul induce el regreso al estado I. Durante los periodos de iluminación se aplicaron pulsos saturantes para obtener los parámetros F_m y F_{ma} , definido este último como la fluorescencia máxima de la clorofila a en luz azul.

4.2 Absorbancia de P700: Actividad del PSI

La forma oxidada del PSI o P700 presenta un máximo de absorbancia entre 800 y 840 nm. Mediante un módulo específico integrado en el Dual PAM-100 es posible analizar los cambios del estado *redox* del P700 debido a los cambios en la absorbancia de las suspensiones celulares a 830 nm. La señal emitida mediante el Dual PAM-100 representa la diferencia entre las señales de 830 y 875 nm. Las medidas del P700 se realizaron en las mismas condiciones descritas en el apartado 4.1.

4.2.1. Determinación de la cantidad máxima fotooxidable del PSI (P_m)

Durante el periodo de oscuridad, el P700 se encuentra totalmente reducido y por lo tanto los procesos que aceptan electrones procedentes del P700 se encuentran inactivos, como por ejemplo el ciclo de CBB. Las células se ajustaron a la misma concentración celular ($4\cdot 10^7$ células·ml⁻¹) o a la misma concentración de clorofila (5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), y se adaptaron a 15 minutos de oscuridad. Posteriormente se aplicó luz en el rango de rojo lejano (FR) (730 nm, 75 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ y 20 s), que es absorbida preferentemente por el PSI. Debido a que se produce una reducción simultánea del P700⁺ por el CET y las vías catabólicas en presencia de este FR, se aplicó un pulso saturante (635 nm, 10.000 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 200 ms) en presencia del FR para alcanzar el nivel máximo de oxidación o la capacidad máxima fotooxidable del PSI denominado P_m . Para inhibir el LET se incubó durante 2 minutos con 20 μM de DCMU antes del registro de los datos.



4.2.2. Tasas de transporte de electrones

La determinación de la tasa de transporte de electrones fotosintético, tanto el LET como CET, así como el transporte de electrones debido a la respiración (R), se llevó a cabo de la siguiente manera: las células se ajustaron a $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se adaptaron 15 minutos a oscuridad, posteriormente se aplicó una luz actínica azul (440 nm , $100 \mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 30 s y finalmente se calculó el tiempo medio ($t_{1/2}$) de re-reducción del P700 en oscuridad, en ausencia y en presencia de inhibidores. En primer lugar, se realizaron las cinéticas de P700 en ausencia de inhibidores, tras las cuales las células se incubaron durante 2 minutos con DCMU ($20 \mu\text{M}$), para bloquear los electrones procedentes del PSII y cuantificar su contribución a la re-reducción del PSI. Posteriormente, las células en presencia de DCMU se incubaron durante 2 minutos con cianuro potásico (KCN 1 mM) que permite discriminar el transporte de electrones hacia las oxidasas terminales (COX y Cyd), siendo en este caso la re-reducción del PSI dependiente de los electrones procedentes del CET.

Para el cálculo del tiempo medio ($t_{1/2}$) de re-reducción de P700 se utilizó el software OriginPro 8, que permitió obtener la constante de velocidad definida como $k=1/t_{1/2}$. Finalmente, el cálculo de las tasas de transporte de electrones se realizó de la siguiente forma:

- Flujo de electrones lineal: $k(\text{sin inhibidores}) - k(\text{DCMU})$
- Flujo de electrones cíclico: $k(\text{DCMU})$
- Flujo de electrones respiratorio a COX/Cyd: $k(\text{DCMU/KCN}) - k(\text{DCMU})$

4.3 Análisis del gradiente de protones (ΔpH)

Los cambios en el gradiente de protones (ΔpH) a través de las membranas tilacoidales se midió utilizando el método descrito por Teuber (Teuber et al. 2001), utilizando el módulo AO/AY del Dual PAM-100 y el colorante amarillo de acridina de Sigma Aldrich (AY) como indicador de pH. El módulo AO/AY presenta una lámpara LED de excitación azul (pico de emisión a 455 nm), un fotodetector con filtros para fluorescencia verde ($500\text{-}570 \text{ nm}$) y un preamplificador de señal de pulso modulado. Así, la iluminación con luz actínica roja ($1.000 \mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) permite observar un aumento en la fluorescencia relacionada con la alcalinización del citosol a la vez que se produce la acidificación del lumen tilacoidal. Las suspensiones celulares se ajustaron a una concentración de $20 \mu\text{M}$ de clorofila, se incubaron durante 15 minutos en oscuridad y en presencia de AY a una concentración final de $5 \mu\text{M}$.



4.4 Medida de la fluorescencia del NAD(P)H

Las medidas de la fluorescencia del NAD(P)H inducidas por luz se realizaron utilizando el módulo NADPH/9-AA incorporado en el Dual PAM-100 (Schreiber y Klughammer, 2009) y en las mismas condiciones descritas en el apartado 4.1. El módulo NADPH/9-AA presenta una lámpara LED de excitación máxima a 365 nm, un fotomultiplicador con filtros para fluorescencia verde (500-570 nm) y un preamplificador sensible al azul con filtros de transmisión entre 420 y 550 nm. De esta forma, se detecta la fluorescencia del NAD(P)H en la región espectral azul-verde, donde el NAD(P)⁺ no fluoresce. Una vez que las células se adaptaron a oscuridad (15 minutos), los niveles de fluorescencia del NAD(P)H se registraron con una frecuencia de 100 Hz. La posterior iluminación con la luz actínica definida en nuestras condiciones estándar de crecimiento (50 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) permitió obtener los niveles de fluorescencia en esta nueva situación con una frecuencia de 5000 Hz. En el caso de utilizar GA (10 mM) o DCMU (20 μM), éste se añadió inmediatamente antes de la adaptación de los cultivos a los 15 minutos de oscuridad.

4.5 Evolución de oxígeno mediante electrodo de Clark

La determinación de la producción y el consumo de oxígeno en *Synechocystis* se realizaron utilizando un electrodo de tipo Clark (Chlorolab 2+ System de Hansatech). Para ello, las células se ajustaron a $2\cdot 10^7$ células·ml⁻¹ o 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila en medio BG11 a las que se le añadió 10 mM de NaHCO₃ antes del inicio de las medidas. Para obtener la producción de oxígeno en la luz actínica definida en nuestras condiciones estándar (50 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), las células se iluminaron durante 15 minutos. Por otro lado, el consumo de oxígeno se registró manteniendo las células durante 15 minutos en oscuridad. En ambos casos, la temperatura se ajustó a 30°C.

4.6 Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

El análisis de las ROS presentes en las células se realizó según el método descrito por Joo (Joo et al., 2005) y modificado por Pérez-Pérez (Pérez-Pérez et al., 2012). Para ello se utilizó la sonda 5-(y-6)-clorometil-2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína de éster de acetilo (CM-H₂DCFDA) de Invitrogen, ampliamente utilizado como indicador de ROS. La oxidación de este compuesto debido a las ROS produce 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente. Las longitudes de onda para medir la fluorescencia del DCF son 458 nm para la excitación y 525 nm para la emisión. De esta forma, se recogieron 10⁸ células·ml⁻¹ que se utilizaron para preparar extractos celulares. Como control negativo se utilizó 100 mM de ascorbato de sodio. Las muestras en presencia y ausencia de ascorbato de sodio se incubaron a



25°C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió 25 μ M de CM-H₂DCFDA y se incubó 30 minutos a 30°C. La fluorescencia se midió en el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX de Thermo Fisher Scientific con una excitación/emisión de 485 y 525 nm respectivamente.

4.7 Citometría de flujo

4.7.1. Conteo de células

Para cuantificar el número de células presentes y establecer una correlación con la densidad óptica a 750 nm (DO_{750nm}), se utilizó un citómetro de flujo BD Influx™ de BD Biosciences del Servicio de Microscopía Confocal y Citometría de Flujo del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Para ello, una cantidad conocida de DO_{750nm} se hizo pasar por el citómetro de flujos hasta alcanzar 1.000.000 de células, el volumen utilizado para ello permitió establecer la correlación entre número de células y DO_{750nm} .

4.7.2. Análisis del tamaño y complejidad celular

El citómetro de flujo *BD Influx*™ de BD Biosciences también permitió analizar cambios en el tamaño y la complejidad interna o la granularidad celular mediante los parámetros Forward Scatter o dispersión frontal (FSC) y Side Scatter o dispersión lateral (SSC) respectivamente. Para cuantificar los resultados obtenidos en el citómetro de flujo, se realizó el calibrado con gránulos de referencia de tamaño en colaboración con el Servicio de Microscopía Confocal y Citometría de Flujo del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF).

4.8 Microscopía

4.8.1. Microscopía de campo claro y fluorescencia

Para obtener imágenes de las células en campo claro y realizar un seguimiento de los niveles de fluorescencia totales presentes en las células, se utilizó un Microscopio de Fluorescencia Leica DM6000, del Servicio de Microscopía Confocal y Citometría de Flujos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Los niveles relativos de fluorescencia se determinaron mediante el programa ImageJ del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

4.8.2. Microscopía de fluorescencia confocal

Para analizar la distribución de los pigmentos fotosintéticos asociados a las membranas tilacoidales, se utilizó un Microscopio de Fluorescencia Láser Confocal Leica SP2 (excitación y emisión), del Servicio de Microscopía Confocal y Citometría de



Flujo del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF). Los niveles relativos y la distribución de la fluorescencia se determinaron mediante el programa ImageJ del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

4.8.3. Microscopía electrónica

Para obtener fotografías de las células mediante microscopía electrónica, se realizó parte del protocolo facilitado por el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS).

El procedimiento se realizó utilizando del orden de 10^8 células cultivadas en condiciones estándar de crecimiento. Estas células se centrifugaron (4.500 rpm, 4°C y 10 minutos), se lavaron varias veces con medio BG11C fresco y se resuspendieron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.4). Las muestras se incubaron a 4°C durante 3 horas y en agitación suave. Se centrifugaron y se lavaron 2 veces con tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.4). En el Servicio de Microscopía del CITIUS se llevó a cabo la inclusión de las muestras en la resina y los cortes. Las muestras, una vez procesadas, se analizaron y fotografiaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión con filtro de energía Carl Zeiss. LIBRA® 120.

5. Métodos de Proteómica

5.1 Identificación de proteínas

Los geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie Brilliant blue según el apartado 3.4.1, se secaron y las proteínas se extrajeron desde los geles mediante el sistema de escisión automatizado EXQuest Spot Cutre de Bio-Rad, según el protocolo del fabricante. Posteriormente, las muestras se rehidrataron en 100 μ l de NH_4HCO_3 50 mM con 15 μ l de tripsina (0.1 μ l/ μ l) en HCl 1 mM durante 14 horas a 37°C. Los péptidos se extrajeron con 20 μ l de ácido trifluoroacético (TFA) 0.5% (v/v). Finalmente, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas de MALDI-TOF empleando un aparato Autoflex de Bruker Daltonics y se identificaron las proteínas mediante la búsqueda en la base de datos del NCBI.

6. Ensayos enzimáticos

6.1 Determinación enzimática de la fructosa-1,6-bisfosfatasa

Para determinar la actividad enzimática fructosa-1,6-bisfosfatasa se recogieron cuatro muestras de cada punto con $2 \cdot 10^8$ células cada uno y se centrifugaron (4.500 rpm, 4°C y 5 minutos). Posteriormente, se retiró el sobrenadante de todas las muestras y se resuspendieron en un tampón que contiene Tris-HCl 175 mM (pH 8), MgCl_2 17.5



mM. Se añadió DTT 10 mM a dos muestras y la misma cantidad de H₂O a las otras dos muestras. Para permeabilizar las células se añadió 20 µl de una mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio (MTA) al 1.25% (p/v) a cada muestra y se agitó en vórtex durante 5 segundos. Se añadió fructosa-1,6-bisfosfato 8 mM a dos muestras, una con DTT y otra sin DTT, y la misma cantidad de H₂O a las otras dos. Todas las muestras se incubaron durante 15 minutos a 30°C, se centrifugaron (4.500 rpm, 5 minutos) y se midieron a 660 nm después de añadir 2 ml del reactivo Fiske-Subbarow.

6.2 Determinación enzimática de glucógeno

Los niveles de glucógeno se cuantificaron según el método descrito por Xu (Xu et al., 2013) con algunas modificaciones. Para ello, se recogieron 10⁸ células mediante centrifugación (4.500 rpm, 4°C y 5 minutos) y se eliminó todo el medio de cultivo. Posteriormente, las células se resuspendieron en 300 µl de acetato sódico (30 mM y pH 5.2) y se rompieron mediante *beadbeater* y perlas de vidrio de Retsch (0.1-0.25 mm de diámetro). Dos alícuotas de 100 µl cada una de la suspensión celular, se hirvieron (100°C) durante 20 minutos. Una de ellas se trató con 10 U de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich) y se incubó toda la noche a 55°C, además de la muestra sin tratar. La glucosa liberada se determinó en las dos alícuotas utilizando el método de glucosa oxidasa/peroxidasa (catálogo #GAGO-20 Sigma Aldrich). Para ello, se realizó una curva patrón con glucógeno comercial. Finalmente, el contenido de glucógeno se determinó restando la glucosa presente en las muestras que no se trataron con amiloglucosidasa.

6.3 Determinación enzimática de la cianoficina

La extracción de cianoficina se realizó según el método descrito por Elbahloul (Elbahloul et al., 2005) con algunas modificaciones. Para ello, se recogieron 10⁹ células mediante centrifugación (4.500 rpm, 4°C y 5 minutos) y se eliminó el medio de cultivo. Las células se resuspendieron en 1 ml de acetona 100% y se incubaron en un agitador de laboratorio (Eppendorf Thermomixer Compact 5350) a temperatura ambiente en agitación (900 rpm) durante 30 minutos.

Después de una segunda centrifugación (13.000 rpm, 4°C y 15 minutos), la acetona se retiró, el precipitado celular se resuspendió en 1.5 ml de HCl 0.1 M y se incubó en el agitador de laboratorio a una temperatura de 60°C en agitación (900 rpm) durante 60 minutos para solubilizar la cianoficina. Las muestras se centrifugaron (13.000 rpm, 4°C y 15 minutos) para eliminar los restos celulares y el sobrenadante resultante corresponde con la cianoficina soluble.



La adición de 720 μ l de Tris/HCl 0.1 M pH 8.0 y la incubación a 4°C durante 40 minutos produce la precipitación de la cianoficina. Tras una nueva centrifugación (13.000 rpm, 4°C y 15 minutos) se obtiene el gránulo de cianoficina y después de retirar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500 μ l de HCl 0.1 M.

La cuantificación de cianoficina se realizó según el método descrito por Messineo utilizando la reacción de Sakaguchi, un método de detección de arginina (Messineo, 1966). Para ello, se añadió 250 μ l de un reactivo A (300 mg de yoduro de potasio en 100 ml de H₂O MilliQ). Posteriormente se añadió 750 μ l de un reactivo B (100 ml de KOH 5 M, 2 mg de tartrato sódico potásico, 100 mg de 2.4-dicloro-1-naftol, 180 ml de etanol absoluto y 9.33 ml de hipoclorito sódico al 5%), y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Finalmente, se añadió 250 μ l de un reactivo C (20 ml de hipoclorito sódico al 5% diluido en 100 ml de H₂O MilliQ), se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió en el espectrofotómetro a 520 nm. Para la cuantificación se realizó una curva patrón con arginina.

7. Métodos bioinformáticos

7.1 Análisis transcriptómico

El alineamiento de las secuencias de ARNm con la última versión del genoma de referencia de *Synechocystis* (ASM34078v1) se realizó mediante *Bowtie2* (v.2.3.4.2) (Langmead y Salzberg, 2012). La expresión diferencial de las lecturas de cada transcrito se realizó con el programa *Cuffdiff2* del paquete *Cufflinks* (Trapnell et al., 2012). Para considerar diferencias significativas se utilizó un valor *p* ajustado de 0.05. Para las regiones de inicio de la transcripción (TSS) se utilizaron como referencia datos experimentales de varias publicaciones (Kopf et al., 2014; Mitschke et al., 2011).

El análisis de ontología génica (análisis GO) a partir de los genes con cambios significativos en la expresión génica definidos como $\log_2 > \pm 1$ y valor *p* ajustado < 0.05 , se realizó utilizando la plataforma Synergy (synergy.plantgenie.org). Los términos GO redundantes se eliminaron posteriormente utilizando la plataforma REVIGO (revigo.irb.hr).

Para la representación de los resultados se utilizó el programa Multiple Experiment Viewer 4.9.

7.2 Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas de dos bases de datos IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se alinearon mediante el algoritmo "MUSCLE" incorporado en el programa MEGA 7.0.26. El árbol filogenético se realizó mediante el método estadístico de Máxima Verosimilitud. Para seleccionar el modelo que mejor se



ajusta a cada análisis, se tomó como referencia el modelo con menor valor en el Criterio de Información Bayesiano (BIC).

8. Otros métodos analíticos

8.1 Determinación de la concentración de la clorofila

La concentración de clorofila *a* se determinó espectrofotométricamente según el método descrito por McKinney (Mackinney, 1941). Un determinado volumen de células se recogió, se centrifugó (13.000 rpm, 3 minutos) y se eliminaron 900 µl de sobrenadante. El sedimento se resuspendió en los 100 µl restantes, se añadió 900 µl de metanol absoluto y se agitó vigorosamente mediante un vórtex durante 30 segundos. Finalmente, las muestras se centrifugaron (13.000 rpm, 3 minutos) y la concentración de clorofila se determinó en el sobrenadante, midiendo la absorbancia a 665 nm. Para el cálculo se empleó un coeficiente de extinción de 74.46 mM⁻¹·cm⁻¹.

8.2 Determinación de la concentración de ficobiliproteínas

Para determinar el contenido en ficobiliproteínas se utilizó el método descrito por Siegelman y Kycia (Siegelman y Kycia, 1978), con alguna modificación. Las muestras sonicadas (ver detalles en el apartado III.3.1.2) se diluyeron en 2 ml de H₂O miliQ y se midieron las absorbancias a 615, 652 y 730 nm, agitando inmediatamente antes de medir.

Para el cálculo de la concentración de ficocianina y aloficocianina se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Ficocianina } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{(A_{615}-A_{730})-0.474(A_{652}-A_{730})}{5.34} \cdot \frac{3000\cdot\text{Volumen H}_2\text{O}}{\text{Volumen cultivo}}$$

$$\text{Aloficonina } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{(A_{652}-A_{730})-0.474(A_{615}-A_{730})}{5.09} \cdot \frac{3000\cdot\text{Volumen H}_2\text{O}}{\text{Volumen cultivo}}$$

8.3 Determinación de la concentración de carotenoides

Para determinar el contenido en carotenoides se utilizó el método descrito por Davies (Davies, 1976), con alguna modificación. Para ello, 1 ml de las muestras sonicadas (ver detalles en el apartado 3.1.2) se diluyeron en 4 ml de acetona pura y se agitaron fuertemente. Posteriormente, las muestras se dejaron en hielo durante 3 horas, se centrifugaron (13.000 rpm, 20 minutos y 4°C) y se midieron las absorbancias a 480, 663 y 645 nm en el sobrenadante.

Para el cálculo de la concentración de carotenoides se utilizó la siguiente fórmula:



MATERIALES Y MÉTODOS

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{(A_{480} + 0.114 \cdot A_{663} - 0.638 \cdot A_{645})}{5.34} \cdot \frac{20 \cdot \text{Volumen H}_2\text{O}}{\text{Volumen cultivo}}$$

8.4 Medidas espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia de luz visible se realizaron en un espectrofotómetro Biomate 5 (Thermo Electron Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.5 Medidas del pH

El pH de las disoluciones se midió con un pH-metro modelo Basic 20 (Crison) siguiendo las instrucciones del fabricante.



IV. RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

1. STXA2, un mutante con bajos niveles de TrxA

1.1 Generación del mutante STXA2

Como se ha descrito en la Introducción, los intentos de obtener un mutante carente de la tiorredoxina TrxA han sido infructuosos, lo que sugiere que dicha TRX es esencial (Muller y Buchanan, 1989; Navarro y Florencio, 1996). Con objeto de poder abordar el papel de esta proteína esencial *in vivo*, se han construido estirpes mutantes del gen *trxA* de expresión condicional en *Synechocystis*. En estas estirpes se podría modular la expresión de dicho gen y por lo tanto conseguir niveles bajos de TrxA teniendo en cuenta que es la TRX más abundante en *Synechocystis* (Florencio et al., 2006). Para ello, la expresión del gen *trxA* se realizó bajo el control de un promotor inducible por arsenito sódico o NaAsO_2 (en adelante arsenito o inductor), denominado P_{arsB} . Este promotor regula la transcripción del operón *arsBHC* responsable de la resistencia a arsénico en *Synechocystis*, donde el gen *arsB* corresponde a un transportador de arsenito al exterior celular (López-Maury et al., 2014). La elección de este promotor se debe a que permite una expresión nula de cualquier gen en ausencia de arsenito, y la inducción del gen ocurre rápidamente tras la adición del inductor al medio.

Para asegurar unos niveles relativamente bajos de TrxA se realizaron modificaciones del sitio de unión al ribosoma (RBS) que, junto al promotor, tiene un fuerte impacto en la expresión del gen (Englund et al., 2016). Para expresar el gen *trxA* se llevaron a cabo dos estrategias. Por un lado, se utilizó una plataforma plasmídica disponible en el grupo que contiene el promotor P_{arsB} y el gen *glnN* (codifica la proteína glutamina sintetasa de tipo III) interrumpido con el gen de resistencia a nourseotricina, y que se encuentran insertos en el plásmido pBluescript II SK(+) (pBSII-KS(+)). El gen *trxA* se amplificó a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos TrxA_ *NdeI* y TrxA_ *NotI*. El fragmento generado se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *NotI*, y se clonó en el plásmido, dando lugar al plásmido pBS-TRXA2 (Figura 12A). Por otro lado, se utilizó el método de la PCR solapante para generar otro plásmido que contiene un RBS diferente al plásmido pBS-TRXA2 (ver detalles en el apartado III.2.4.6). Para la PCR solapante se utilizaron los oligonucleótidos internos del gen *trxA* $P_{arsB_TrxA_5' _R}$ y $P_{arsB_TrxA_5' _F}$, y los oligonucleótidos externos $P_{arsB_EcoRI_F}$ y $TrxA_3' _R$ (Tabla 7). El fragmento de ADN resultante se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, y se clonó en el plásmido anteriormente mencionado. El plásmido generado, denominado pBS-TRXA3, conserva el RBS situado delante del ATG del gen *arsB* en la nueva construcción (Figura 12A).



RESULTADOS

Los plásmidos generados se utilizaron para transformar la estirpe silvestre (WT) de *Synechocystis*. La correcta integración en el genoma y el grado de segregación de las estirpes se analizó mediante PCR (Figura 12B), obteniéndose las estirpes STXA2P (a partir de pBS-TRXA2) y STXA3P (a partir de pBS-TRXA3). Además de la estirpe WT, también se transformó una estirpe SarsR (SR), carente del gen *arsR*, que regula al operón *ArsBHC*. Esta estirpe presenta niveles constitutivos de expresión del operón y no responde a arsenito (Sánchez-Riego et al., 2014), obteniéndose las estirpes SRTXA2P y SRTXA3P.

Posteriormente, se procedió a la delección del gen *trxA* de su locus original en las estirpes STXA2P, STXA3P, SRTXA2P y SRTXA3P, para ello se utilizó el plásmido pGQ5.4+ (construido por Ana María Sánchez Riego). Este plásmido contiene un fragmento de 564 pb aguas arriba del gen *trxA*, incluyendo las primeras 27 pb del gen, el gen de resistencia a espectinomicina y un fragmento de 780 pb aguas abajo de *trxA*.

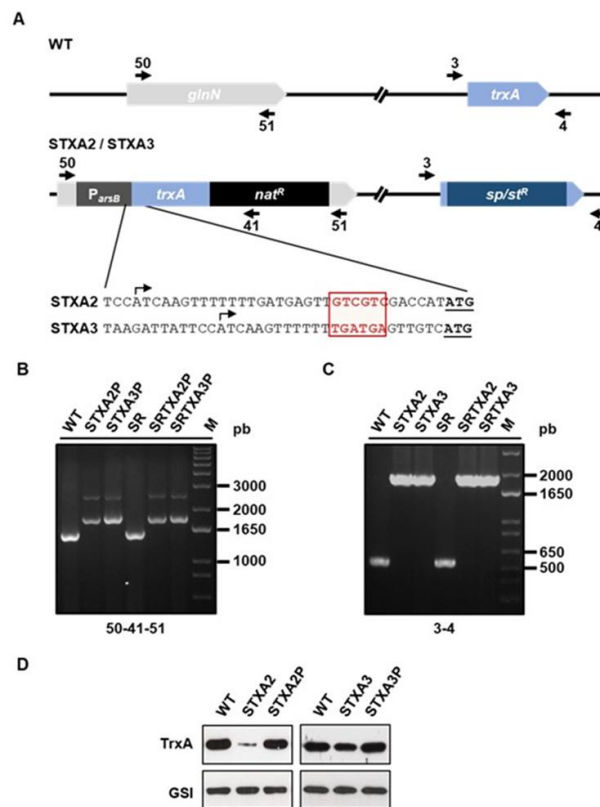


Figura 12. Construcción de estirpes mutantes con distintos niveles de TrxA. (A) Esquema de la inserción del gen *trxA* en el locus del gen *glnN* y bajo el control del promotor *P_{arsB}* inducible por arsenito y de la delección del gen *trxA*. La flecha indica el inicio de la transcripción y el cuadrado rojo indica el sitio RBS teórico. **(B)** Análisis mediante PCR del grado de segregación de las estirpes mutantes STXA2P, SRTXA2P, STXA3P y SRTXA3P con los oligonucleótidos 50, 41 y 51 indicados en A. **(C)** Análisis mediante PCR del grado de segregación de los mutantes SRTXA2, STXA2, SRTXA3 y STXA3 con los oligonucleótidos 3 y 4 indicados en A. **(D)** Análisis



RESULTADOS

mediante Western blot de los niveles de TrxA en las estirpes WT, STXA2 y STXA3 en presencia de 1 mM de arsenito. Se obtuvieron extractos crudos solubles a partir de células de las distintas estirpes y se cargaron 20 µg de proteínas para la electroforesis en geles SDS-PAGE. El anticuerpo anti-GSI se utilizó como control de carga.

La transformación permitió obtener las nuevas estirpes denominadas STXA2 y STXA3. La segregación de estas se realizó utilizando distintas concentraciones de arsenito, siendo 1 mM la concentración que permitió la completa segregación en el caso de la estirpe STXA2, mientras que para STXA3, fue posible con concentraciones menores de arsenito. También se consiguieron segregar las estirpes SRTXA2 y SRTXA3. La integración en el genoma y la completa segregación de las estirpes se confirmó mediante PCR (Figuras 12B y 12C).

Los niveles de TrxA en las estirpes STXA2 y STXA3 se determinaron mediante Western blot utilizando extractos celulares de las estirpes cultivadas en presencia de 1 mM de arsenito. Como se observa en la Figura 12D, las diferentes estirpes generadas muestran diferencias en la acumulación de la proteína TrxA. La estirpe STXA2 presenta unos niveles de TrxA del $12.43 \pm 3.15\%$ con respecto a la estirpe WT, mientras que la estirpe STXA3 presenta unos niveles del $68.34 \pm 8.64\%$. Debido a los bajos niveles de TrxA que presentaba la estirpe STXA2 se seleccionó esta para estudiar la función *in vivo* de TrxA en *Synechocystis*.

1.2 Relación entre crecimiento y niveles de TrxA

La utilización de un promotor inducible por arsenito permite analizar el efecto que tiene sobre el crecimiento, distintos niveles de una proteína esencial como TrxA. Con el objetivo de caracterizar el efecto de las diferentes concentraciones de inductor sobre el crecimiento de STXA2, se cultivó en condiciones estándar de crecimiento (ver detalles en el apartado III.1.1.2), y en presencia de una concentración mínima de 10 µM de arsenito durante 3 días, posteriormente se transfirió a medio nuevo en presencia de concentraciones crecientes de arsenito donde se analizó el crecimiento durante 4 días.

En las Figuras 13A y 13B se observa como la estirpe STXA2 presenta una disminución progresiva en el crecimiento a medida que utilizamos concentraciones menores de inductor. La estirpe presenta una tasa de crecimiento de 0.21 ± 0.08 días⁻¹ en presencia de 10 µM de arsenito, que es un 90% inferior que la tasa de crecimiento de la estirpe silvestre (1.75 ± 0.04 días⁻¹) (Tabla 12). Es importante destacar que la estirpe STXA2 no crece en ausencia de inductor y se pierde la viabilidad celular después de 48 horas, reforzando la idea de la esencialidad de esta proteína (Figura 13B). Por otro lado, en presencia de 1 mM de arsenito, la tasa de crecimiento es de 1.17 ± 0.10 días⁻¹, un 30% menor con respecto a la estirpe silvestre en fase exponencial en presencia de inductor que es 1.73 ± 0.10 días⁻¹ (Tabla 12).



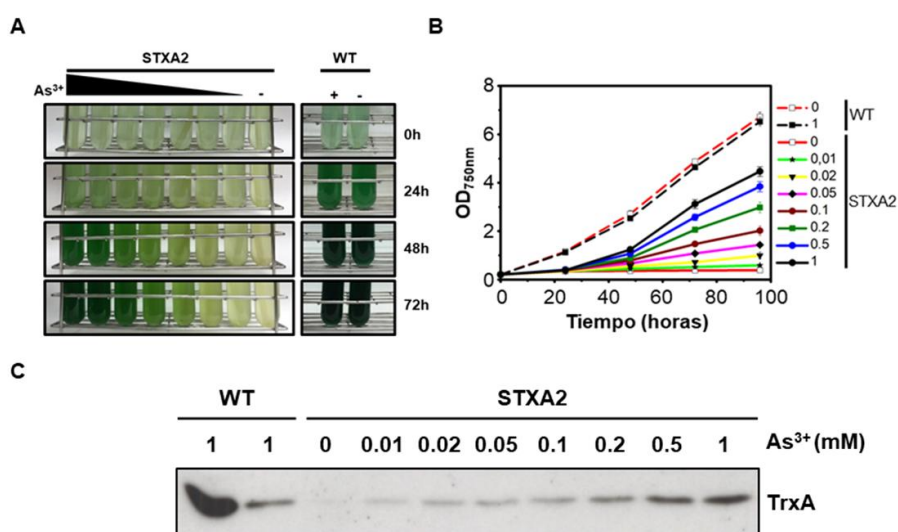


Figura 13. Caracterización de la estirpe STXA2 y niveles de TrxA en diferentes concentraciones de arsenito. (A) Fotografías de las estirpes WT y STXA2 cultivadas durante 3 días en presencia de distintas concentraciones de arsenito. (B) Curva de crecimiento de las estirpes WT y STXA2 correspondiente a (A). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. (C) Análisis mediante Western blot de los niveles de TrxA. Se cargaron 20 μ g de un extracto de proteína celular total, excepto el carril 2 donde se cargaron 2 μ g, y se incubaron con el anticuerpo anti-TrxA.

El análisis mediante Western blot de los niveles de TrxA en la estirpe STXA2 en las condiciones descritas (Figura 13C), permite observar como la cantidad de TrxA disminuye en relación a la disminución en los niveles de inductor en el medio de cultivo. Esto indica que en la estirpe STXA2, los niveles de TrxA están fuertemente regulados por la concentración del inductor.

Tabla 12. Tasas de crecimiento en diferentes concentraciones de inductor.

Estirpe	As ³⁺ (mM)	Tasa de crecimiento μ (días ⁻¹)*
STXA2	0.01	0.21±0.08
	0.02	0.40±0.14
	0.05	0.56±0.11
	0.1	0.72±0.11
	0.2	0.77±0.12
	0.5	0.99±0.01
	1	1.17±0.10
WT	0	1.75±0.04
	1	1.73±0.01

*Para el cálculo se utilizó la fórmula $\mu = \ln(N/N_0)/t$, donde N_0 y N representan los valores de densidad óptica a 750 nm que se encuentran entre 0.2 y 0.8.



RESULTADOS

Además, el análisis del crecimiento de la estirpe STXA2 en diferentes concentraciones de inductor pone de manifiesto la existencia de cambios en los niveles de los pigmentos fotosintéticos en esta estirpe, como se observa en el espectro de absorción de los cultivos (Figura 14A). La cuantificación de la concentración de clorofila (Figura 14B), permite establecer una relación directa entre los niveles de clorofila y de TrxA. Además, se analizaron los cambios en el contenido de las proteínas relacionadas con el PBS en las condiciones descritas. La identificación de las proteínas que forman parte del complejo del PBS mediante espectrometría de masas permite observar una disminución progresiva estas proteínas (Figura 14C), a medida que disminuye la concentración de inductor, y por tanto de TrxA. Entre las proteínas identificadas destacan la subunidad β de la ficocianina (CpcB) y las proteínas conectoras CpcC2 o CpcD, que además son prácticamente indetectables en 10 μM de arsenito.

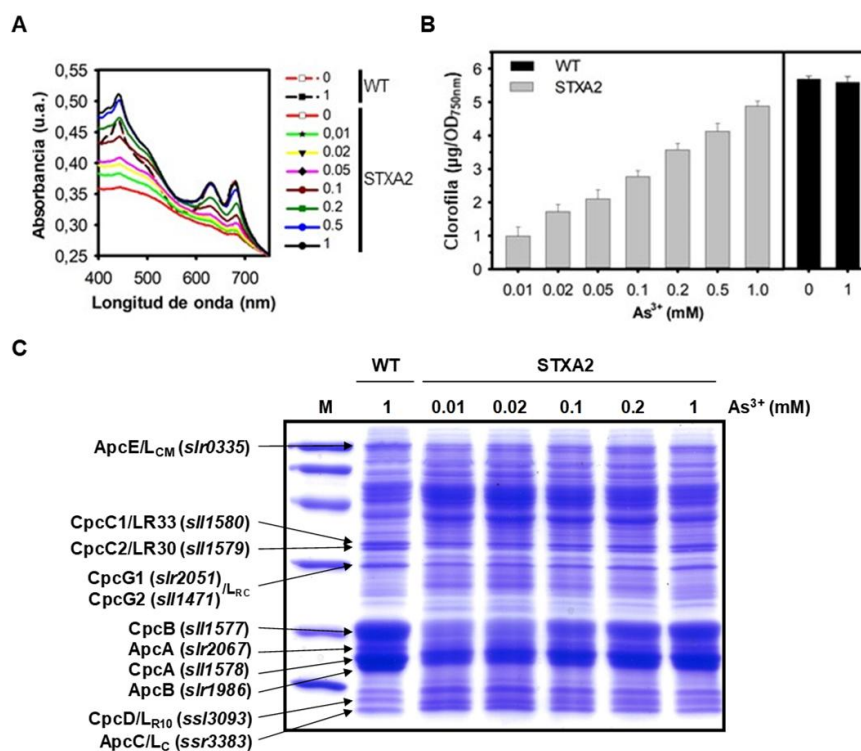


Figura 14. Niveles de clorofila y ficobiliproteínas de la estirpe STXA2 en diferentes concentraciones de arsenito. (A) Espectro de absorción de células enteras y **(B)** contenido en clorofila de las estirpes WT y STXA2 tras 72 horas en diferentes concentraciones de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(C)** Electroforesis en geles SDS-PAGE de las proteínas solubles de las estirpes WT y STXA2 en presencia de diferentes concentraciones de arsenito. Se cargaron 20 μg de proteínas solubles. Posteriormente se identificaron las proteínas indicadas por flechas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).



1.3 Caracterización del crecimiento de STXA2 en condiciones estándar

Como hemos comentado anteriormente, la segregación completa de la estirpe STXA2 solo se obtuvo en presencia de 1 mM de arsenito. En estas condiciones, la estirpe STXA2 presenta unos niveles de TrxA del 10% aproximadamente respecto a la estirpe WT (Figura 13C). Con el objetivo de analizar el fenotipo de STXA2 en condiciones estándar de crecimiento y tras la retirada del inductor del medio, se cultivaron las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito, una vez alcanzada las $3 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹, se lavaron y resuspendieron en medio BG11C nuevo en presencia y ausencia de arsenito. Durante la curva de crecimiento, se determinó el número de células mediante citometría de flujo (ver detalles en el apartado III.4.7.1), y se analizó la expresión y los niveles de TrxA mediante Northern blot y Western blot.

Como se observa en las Figuras 15A y 15B, la estirpe STXA2 en presencia de inductor presenta un retraso en el crecimiento de un 30% aproximadamente con respecto al WT. Tras la retirada del arsenito, el mutante STXA2 se duplica 2 veces aproximadamente durante las primeras 48 horas y posteriormente detiene completamente el crecimiento celular (Figuras 15A y 15B). En esta situación, los niveles de TrxA disminuyen progresivamente como consecuencia de las divisiones celulares y de la degradación de la proteína sin que exista recambio posterior (Figuras 15C y 15D). Después de 48 horas sin inductor, los niveles de TrxA son inferiores al 1%. En la estirpe silvestre, los niveles de TrxA permanecen sin cambios en presencia o ausencia de arsenito. De acuerdo a estos resultados, el análisis de la expresión de *trxA* mediante Northern blot permite observar niveles del 25% aproximadamente con respecto a la estirpe WT en presencia de arsenito, no detectándose transcrito en su ausencia (Figura 15E).

Estos datos sugieren que la proteína TrxA es una proteína esencial para el crecimiento en condiciones estándar. Además, los niveles de TrxA del 10% con respecto a la estirpe WT (obtenidos en presencia de inductor), parecen ser suficientes para el crecimiento.

Teniendo en cuenta los estudios proteómicos realizados en el grupo, en los que se han determinado que existe una redundancia en el conjunto de proteínas diana identificadas para las TRX A, B y Q (Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006), nos planteamos evaluar si existen cambios en los niveles de las otras TRX canónicas presentes en *Synechocystis*, TrxB y TrxQ, o en los niveles de la FTR. Para ello se analizaron los niveles de estas proteínas en la estirpe STXA2 mediante Western blot (Figura 16). También se analizaron dos GRX que podrían compensar la actividad de TrxA en la estirpe STXA2, GrxA y GrxC.



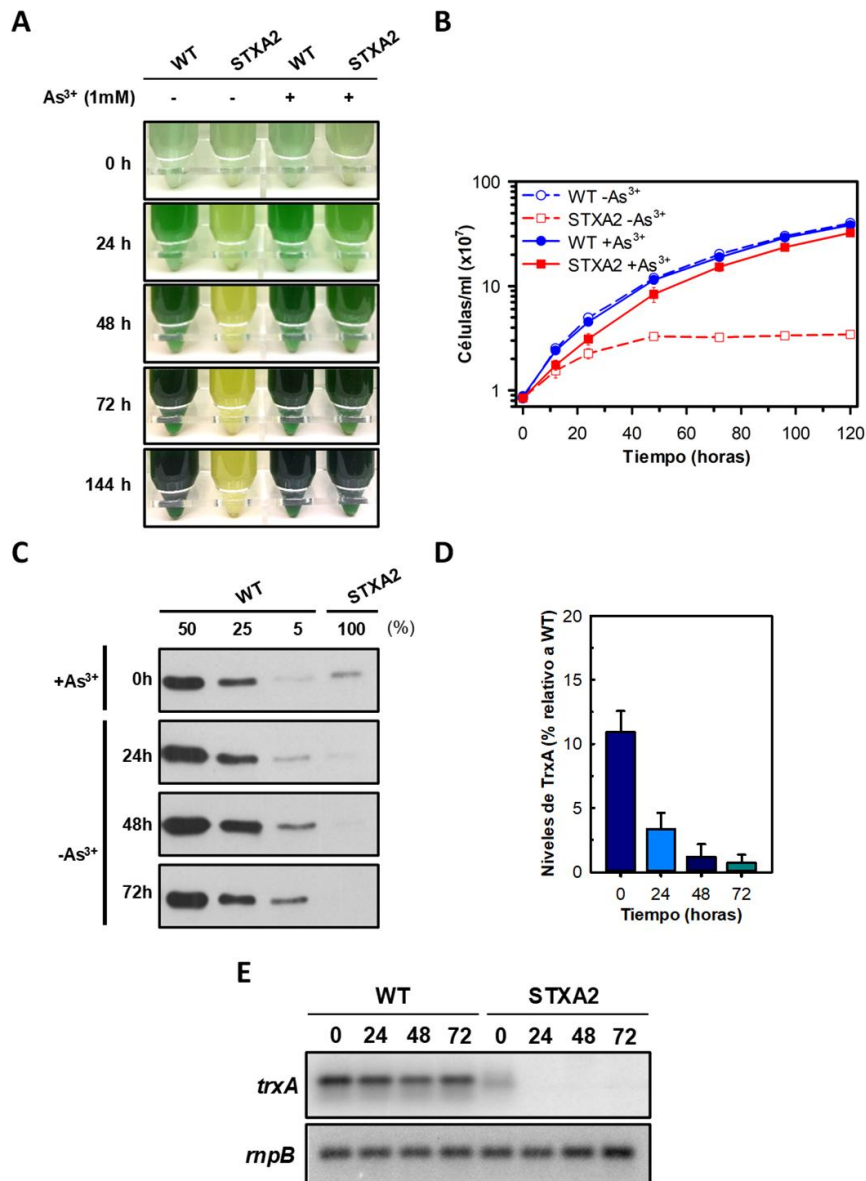


Figura 15. Curva de crecimiento y niveles de TrxA en la estirpe STXA2 tras la retirada de arsenito del medio. (A) Fotografía de los cultivos de las estirpes WT y STXA2 en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito en el medio tomadas en distintos tiempos. **(B)** Curva de crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito. **(C)** Análisis mediante Western blot de los niveles de TrxA en la estirpe STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito y tras su retirada. Los extractos celulares totales correspondientes a 10⁷ células de las estirpes WT y STXA2 se sometieron a una electroforesis en geles SDS-PAGE y se incubaron con el anticuerpo anti-TrxA. Los extractos celulares de la estirpe WT se diluyeron al 50%, 25% y 5% respectivamente (100% corresponde a 10⁷ células de WT). **(D)** Cuantificación de los niveles de proteína de TrxA utilizando los Western blot de C y mediante el programa ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos. **(E)** Análisis mediante Northern blot de la expresión del gen *trxA* en la estirpe STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito y tras su retirada. Se extrajo ARN total de las muestras en los



RESULTADOS

tiempos indicados y se cargaron 4 µg de ARN total y se hibridó con la sonda de *trxA*. Como control de carga de ARN se utilizó la expresión del gen *mmpB*.

En presencia de inductor (t= 0 horas), los niveles de TrxB y TrxQ en STXA2 son del 104.65.54±7.70% y 110.36±11.56% respectivamente con respecto al WT (Figuras 16A y 16B). Por otro lado, después de 48 horas sin inductor se observa un aumento en los niveles de TrxQ (149.10±27.40%) y una pequeña disminución en los niveles de TrxB (86.32±18.95%) con respecto al tiempo inicial (Figuras 16A y 16B). Finalmente, el análisis de las subunidades de la FTR solo permite observar cambios significativos en la subunidad pequeña FTRV después de retirar el inductor con respecto al tiempo inicial (50.48±20.68%) (Figuras 16A y 16B). Por otro lado, se observa un aumento de GrxA (164.60±18.75%) y GrxC (125.23±20.54%) con respecto a los valores iniciales.

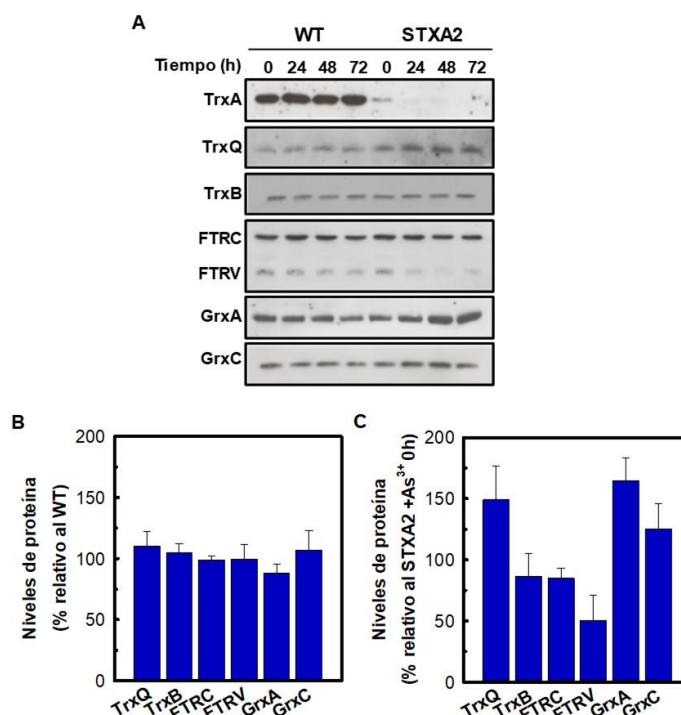


Figura 16. Análisis del sistema FTR/TRX y de dos GRX en la estirpe STXA2. (A) Los extractos celulares totales correspondientes a 10^7 células de las estirpes WT y STXA2 se sometieron a una electroforesis en geles SDS-PAGE y se incubaron con los anticuerpos anti-TrxB, anti-TrxQ y anti-FTR. El tiempo 0 horas corresponde a extractos celulares de las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito, mientras que el resto de tiempos indicados corresponden a las estirpes cultivadas en ausencia de arsenito. (B) Cuantificación de los niveles de TrxQ, TrxB, FTRC, FTRV, GrxA y GrxC en la estirpe STXA2 con respecto al WT a tiempo 0 horas, utilizando los Western blot de A y mediante el programa ImageJ. (C) Cuantificación de los niveles de TrxQ, TrxB, FTRC, FTRV, GrxA y GrxC en la estirpe STXA2 después de 48 horas sin arsenito con respecto al tiempo 0 horas, utilizando los Western blot de A y mediante el programa ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en B y C.



1.4 Caracterización fenotípica de STXA2 con niveles alterados de TrxA

La estirpe STXA2 presenta una serie de alteraciones fenotípicas tras la retirada del inductor del medio, con objeto de analizar las mismas se procedió a determinar los niveles de clorofila, ficobiliproteínas y carotenos (Figura 17). En presencia de inductor, se observa que los niveles de clorofila y ficobiliproteínas son un 20% menores aproximadamente en la estirpe STXA2 con respecto a la estirpe WT (Figuras 17A y 17B). Con respecto a la concentración de carotenoides, se observa una pequeña diferencia de un 12% aproximadamente con respecto a la estirpe WT (Figura 17C). La retirada del inductor produce una disminución del 70% aproximadamente en los niveles de clorofila, de 1.07 ± 0.04 a $0.35 \pm 0.03 \mu\text{g}/10^7$ células, después de 48 horas sin arsenito (Figura 17A). Además, los niveles de ficobiliproteínas disminuyen en el mismo porcentaje, de 15.21 ± 1.04 a $5.19 \pm 0.71 \mu\text{g}/10^7$ células (Figura 17B), y los niveles de carotenoides apenas cambian (Figura 17C). Cuando se representa la relación entre la concentración de ficobiliproteínas y carotenoides con respecto a los niveles de clorofila a se observa como la relación ficobiliproteínas/clorofila a no presenta grandes cambios, mientras aumenta significativamente la relación carotenoides/clorofila a (Figura 17D).

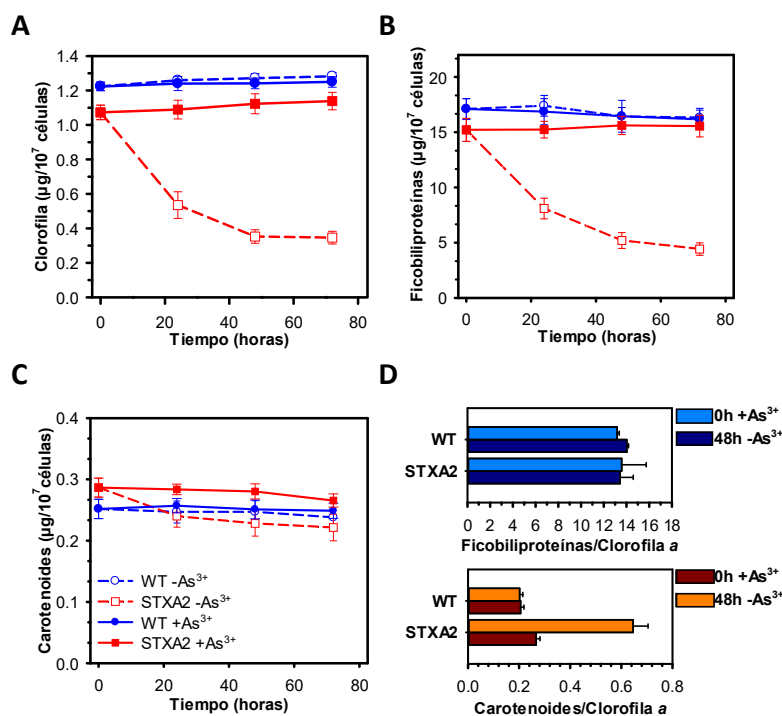


Figura 17. Efecto de la disminución de TrxA en el contenido de clorofila, ficobiliproteínas y carotenoides. Medidas del contenido en clorofila (A), carotenoides (B) y ficobiliproteínas (C) en presencia de 1 mM de arsenito y tras la retirada del mismo. Las condiciones de cultivo se detallan en el texto y las extracciones y cuantificaciones se realizaron como se indica en los apartados III.8.1, III.8.2 y III.8.3. (D) Relación ficobiliproteínas/clorofila a y carotenoides/clorofila a



RESULTADOS

a obtenido a partir de A, B y C, en presencia de 1 mM de arsenito ($t = 0$ horas) y tras 48 horas sin arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

1.5 Análisis de estirpes revertientes espontáneas

La retirada del inductor del medio de cultivo detiene el crecimiento en la estirpe STXA2 después de 48 horas. Sin embargo, cuando el cultivo se mantiene en esas condiciones restrictivas durante un tiempo superior (6-8 días), en algunas ocasiones se observa la aparición de una pequeña población que crece en esas condiciones (Figura 18). Para determinar las características de estas estirpes mutantes revertientes, se aislaron y caracterizaron colonias aisladas denominadas STXA2R.

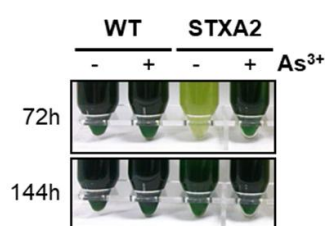


Figura 18. Aparición de estirpes mutantes revertientes. (A) Fotografías de los cultivos de las estirpes WT y STXA2 en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito en el medio. Fotografías tomadas a las 72 y 144h.

El análisis mediante Western blot de la TrxA en la estirpe STXA2R permite observar como esta estirpe en presencia y en ausencia de arsenito presenta niveles de TrxA similares (Figura 19A). Estos resultados indican que bajo condiciones restrictivas existe una pérdida en la regulación dependiente de arsenito, produciéndose la expresión constitutiva del gen *trxA*. Esta desregulación observada en los revertientes puede ser debido a una pérdida de la función represora de ArsR. Por ello, se secuenció el gen *arsR* en varias colonias STXA2R aisladas, donde se observa que existe una inserción de 8 nucleótidos (ACTGAATA) en la secuencia del gen, que produce además de un cambio del marco de lectura, la aparición de un codón de terminación (TGA) (Figura 19B). Esto implica que el polipéptido generado en esta estirpe STXA2R presente 44 aminoácidos, más pequeño que la proteína silvestre ArsR (104 aminoácidos) (Figura 19C). Esta proteína truncada no lleva a cabo la función represora sobre el gen *trxA*, por lo que la proteína se expresa de forma constitutiva sin arsenito en el medio.



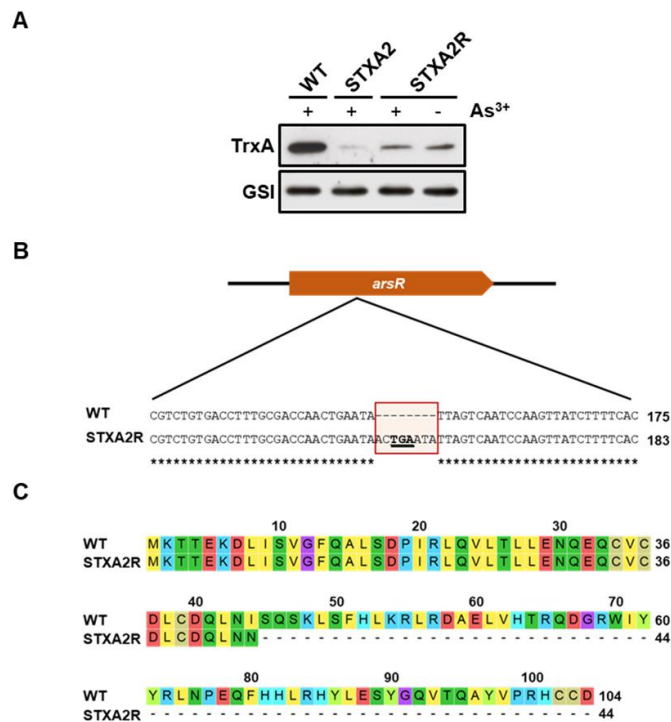


Figura 19. Análisis de las estirpes revertientes STXA2R. (A) Análisis mediante Western blot de los niveles de TrxA en la estirpe STXA2R en ausencia y presencia de 1 mM de arsenito. Se realizaron extractos crudos solubles a partir de células de las distintas estirpes y se cargaron 20 µg de proteínas para la electroforesis en geles SDS-PAGE. El anticuerpo anti-GSI se utilizó como control de carga. **(B)** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de un fragmente del gen *arsR* de las estirpes WT y STXA2R. **(C)** Alineamiento de las secuencias aminoácidos de ArsR de las estirpes WT y STXA2R.

1.6 Crecimiento de STXA2 en diferentes condiciones de cultivo

Desde el punto de vista metabólico, *Synechocystis* puede crecer en diferentes condiciones dependiendo de la luz y la fuente de carbono utilizada. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de obtener y cultivar estirpes mutantes de algunos genes esenciales cuando se establecen determinadas condiciones de crecimiento, como es el caso de muchos genes que están implicados en el aparato fotosintético (Jansson et al., 1987). Esto nos llevó a analizar el crecimiento de la estirpe STXA2 en ausencia de inductor y en condiciones mixotróficas o fotoheterotróficas, teniendo en cuenta la limitación en el crecimiento en condiciones fotoautotróficas descrita anteriormente. Para ello, las estirpes WT y STXA2 cultivadas en medio BG11C y en presencia de 1 mM de arsenito, se lavaron y resuspendieron en medio BG11C (fotoautotrofia), medio BG11C y 10 mM de glucosa (mixotrofia), y en medio BG11C, 10 mM de glucosa y 20 µM de DCMU (fotoheterotrofia), en presencia o ausencia de 1 mM



RESULTADOS

de arsenito en todas las condiciones. La intensidad lumínica se ajustó a 15 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

En las Figuras 20A y 20B se observa como la estirpe STXA2 en presencia del inductor crece en las diferentes condiciones, aunque presenta diferencias fenotípicas con respecto a la estirpe WT, principalmente en condiciones mixotróficas. La retirada del arsenito del medio detiene el crecimiento y produce la muerte celular en condiciones mixotróficas y fotoheterotróficas. Este análisis refuerza los resultados previos sobre el papel esencial de TrxA en las diferentes condiciones de crecimiento, siendo además necesarios unos niveles mínimos de esta proteína para evitar la muerte celular en presencia de glucosa.

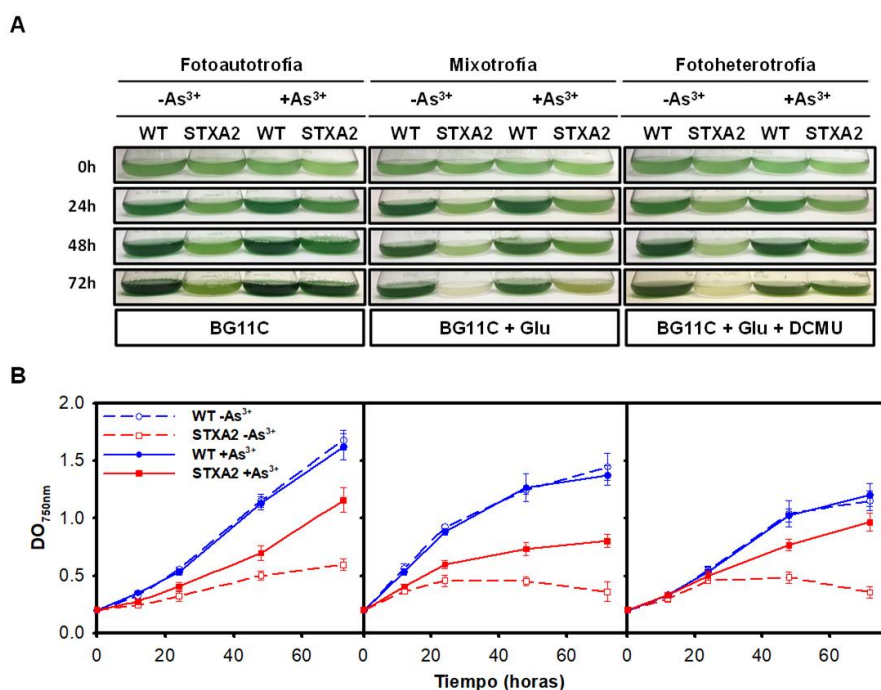


Figura 20. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en distintas condiciones de crecimiento. Fotografías de la evolución en el tiempo (A) y curvas de crecimiento (B) de las estirpes WT y STXA2 en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito en el medio en condiciones fotoautotróficas, mixotróficas y fotoheterotróficas. La concentración de glucosa utilizada fue de 10 mM y la concentración de DCMU de 20 μM . Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.



2. Efecto del déficit de TrxA sobre las cadenas de transporte de electrones

2.1 Cambios en el estado *redox* del *pool* de plastoquinona y actividad del PSII

Los estudios proteómicos realizados en nuestro grupo de investigación han asignado a TrxA un posible papel en la biogénesis y mantenimiento del aparato fotosintético en cianobacterias. Se han identificado diferentes proteínas diana relacionadas con el PSII, el PSI y el Cit *b₆f*, además de los complejos captadores de luz, la distribución energética y la fijación de carbono fotosintético (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006).

Para analizar estas posibles funciones de TrxA *in vivo*, se utilizó el mutante STXA2 y se analizaron diferentes parámetros fotosintéticos que incluyen la medida de la fluorescencia de la clorofila y la evolución de oxígeno. De esta forma, se han explorado los cambios producidos sobre las cadenas de transporte de electrones en la estirpe STXA2 cultivada en presencia y en ausencia de inductor.

Inicialmente se realizaron cinéticas de inducción-recuperación de la fluorescencia utilizando la técnica de *Pulse Amplitude Modulation* (PAM). Para estas cinéticas se utilizaron cultivos de las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito y después de 48 horas de su retirada. De esta manera, se tomaron células de los cultivos en condiciones estándar de crecimiento y se ajustaron a $2 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹. Posteriormente, se sometieron a un periodo de oscuridad de 15 minutos y se iluminaron con una luz actínica de 50 μ moles fotones·m⁻²·s⁻¹, para finalmente regresar a oscuridad. Durante esta cinética de inducción-recuperación, se realizan una serie de pulsos saturantes de 10.000 μ moles fotones·m⁻²·s⁻¹ durante 100 ms que permite obtener una serie de parámetros relacionados con el estado y el funcionamiento del aparato fotosintético (ver detalles en el apartado 4.1.1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 21.

Tabla 13. Parámetros fotosintéticos determinados mediante PAM-100.

	F_0	F_{md}	F_m	F_s
WT +As ³⁺	0.307±0.007	0.477±0.005	0.495±0.015	0.336±0.018
STXA2 +As ³⁺	0.276±0.010	0.367±0.011	0.453±0.010	0.311±0.009
WT 48h -As ³⁺	0.312±0.010	0.486±0.008	0.503±0.009	0.336±0.004
STXA2 48h -As ³⁺	0.120±0.008	0.147±0.012	0.157±0.012	0.138±0.017
STXA2 48h -As ³⁺ *	0.362±0.016	0.495±0.019	0.513±0.017	0.446±0.021

*Parámetros fotosintéticos en la estirpe STXA2 después de 48 horas sin arsenito utilizando la misma concentración de clorofila que la estirpe WT (2.5 μ g·ml⁻¹). La desviación estándar corresponde a tres experimentos independientes.



RESULTADOS

A partir de células adaptadas a oscuridad, la medida de la fluorescencia F_0 es un buen indicador de los niveles de ficobiliproteínas y clorofilas presentes, debido a que el equipo Dual PAM-100 contiene un emisor de fluorescencia a 620 nm. En presencia de arsenito, la estirpe STXA2 presenta ligeras diferencias en F_0 con respecto a la estirpe WT (Tabla 13), relacionadas con las diferencias observadas en los niveles de clorofila y ficobiliproteínas, que son menores que las del WT (Figura 17). Tras 48 horas sin inductor, la estirpe STXA2 presenta una disminución en el valor de F_0 debido a los cambios observados en la cantidad de clorofila y ficobiliproteínas (Tabla 13).

Igualmente, se determinó el F_0 en la estirpe STXA2 utilizando la misma cantidad de clorofila total que la estirpe WT (Tabla 13). Esta nueva situación permite observar un aumento en F_0 de la estirpe STXA2 con respecto a WT (Tabla 13), que sugiere cambios en el complejo del PSII o la presencia de ficobiliproteínas no conectadas al complejo del fotosistema (Acuña et al., 2016).

En oscuridad, el *pool* de PQ se encuentra reducido debido a los complejos NDH-1 y a la succinato deshidrogenasa (SDH), que intervienen en la respiración (Mullineaux y Allen, 1986; Schreiber et al., 1995). De esta forma, las células se encuentran en el denominado estado de transición II, donde hay un incremento en la absorción de luz sobre el PSI y una disminución sobre el PSII. En esta situación, la aplicación de un pulso de saturación genera un nivel de fluorescencia máxima (F_{md}) (Figura 21A). La iluminación posterior con luz actínica roja ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) junto con la aplicación de pulsos saturantes, produce un ligero incremento en esa fluorescencia máxima (F_m). Este aumento indica un cambio a estado de transición I, que se traduce en un incremento en la absorción del PSII. Además, F_m es mayor cuando se ilumina con luz actínica azul, que excita preferentemente a las clorofilas, como se analiza posteriormente.

Cuando la estirpe STXA2 se encuentra en presencia del inductor, el valor de la fluorescencia máxima en oscuridad F_{md} es menor (0.367 ± 0.011) comparado con la estirpe WT (0.477 ± 0.005) (Figuras 21A y 21B, y Tabla 13). Esta diferencia está relacionada con un “fuerte” estado II en el caso de la estirpe STXA2, donde el *pool* de PQ estaría más reducido en oscuridad posiblemente debido a una mayor tasa respiratoria. Las diferencias se reducen cuando se iluminan con luz actínica. Sin embargo, la estirpe STXA2 después de 48 horas sin arsenito presenta grandes cambios en ambos parámetros cuando se utiliza el mismo número de células (Figura 21D y Tabla 13), y un F_{md} parecido y un F_m ligeramente superior a la estirpe WT si se determinan a igual cantidad de clorofila (Figura 21E y Tabla 13), que reflejan una pérdida en el “fuerte” estado II y que sugieren una nueva situación en la que la tasa respiratoria podría ser menor.



RESULTADOS

La iluminación con luz actínica inicia el transporte de electrones fotosintético, produciendo un aumento en la fluorescencia, indicativo del número de centros de reacción de PSII “cerrados”, y que se corresponde con un aumento en el aceptor primario Q_A reducido (Campbell et al., 1998). Este aumento depende del estado de la cadena de transporte de electrones entre los fotosistemas y del estado de transición. La estirpe WT presenta un aumento instantáneo de la fluorescencia en presencia de luz actínica o F_s , tras el cual, la señal alcanza un estado estable (Figura 21A). Esta estabilización del F_s depende de los procesos que ocurren en el lado aceptor del PSII, principalmente el ciclo de CBB. En estas condiciones de iluminación, la estirpe WT presenta un nivel de F_s estable mucho menor respecto al valor de F_m , que se corresponde con un *pool* de PQ que se encuentra en gran parte oxidado. La estirpe STXA2 en presencia de arsenito presenta un aumento progresivo en F_s tras la iluminación, que alcanza el estado estable a los 100 segundos y cercano al valor de F_s estable de la estirpe WT (Figuras 21A y 21B, y Tabla 13). El aumento inicial está relacionado con el “fuerte” estado II en oscuridad comentado anteriormente, y en menor medida por un retraso en la activación del ciclo de CBB (Figura 21A). Tras la retirada del arsenito del medio se observa un incremento instantáneo en F_s , mucho mayor que el obtenido en la estirpe WT (Figura 21D). Además, se observan menores diferencias entre los valores de F_s y F_m con respecto a las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito, que junto al incremento instantáneo en F_s , indican que existe una dificultad en la capacidad de fotooxidar el *pool* de PQ debido a la limitación en los principales sumideros del PSI, como el ciclo de CBB. Cuando la estirpe STXA2 sin arsenito se ajusta a la misma concentración de clorofila que la estirpe WT, se observan los resultados anteriormente descritos, aunque con niveles de fluorescencia cercanos a la estirpe WT (Figuras 21A-21E, y Tabla 13).

Debido a estas diferencias, se analizó el *Non-Photochemical Quenching* de la fluorescencia del PSII (NPQ_{PSII}), este valor se define en oscuridad como $NPQ_{osc} = F_{mDCMU} - F_{md}$ y en luz $NPQ_{luz} = F_{mDCMU} - F_m$. La medida de la fluorescencia máxima real (F_{mDCMU}), se obtiene después de la adición de DCMU al medio y tras iluminar con luz actínica roja ($50 \mu\text{mol fotonos} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (ver detalles en el apartado III.4.1.1). Esta situación provoca la oxidación completa del *pool* de PQ y la comparativa de los valores F_{md} y F_m permite establecer su estado en luz y en oscuridad. En la estirpe WT, el *pool* de PQ está reducido en oscuridad y se genera un NPQ_{osc} en torno a 0.25 (Figura 22A), que posteriormente disminuye al iluminar hasta un valor de 0.2 debido a la oxidación parcial de las PQ (Figura 22B). La estirpe STXA2 en presencia de arsenito presenta un NPQ_{osc} mayor que la estirpe WT (0,57 frente a 0.25), mientras que no se observan diferencias en el NPQ_{luz} . Esta situación corresponde con un *pool* de PQ más reducido en la estirpe STXA2 con



RESULTADOS

respecto a la estirpe WT en oscuridad (Figuras 22A y 22B). La retirada del inductor conlleva a que la estirpe STXA2 presente una disminución del NPQ_{osc} (Figura 22A), posiblemente debido a cambios en los componentes o en el flujo de electrones respiratorios o debido a una limitación en los estados de transición, y un aumento del NPQ_{luz} relacionado con la limitación aguas abajo de la cadena de transporte de electrones en luz (Figura 22B).

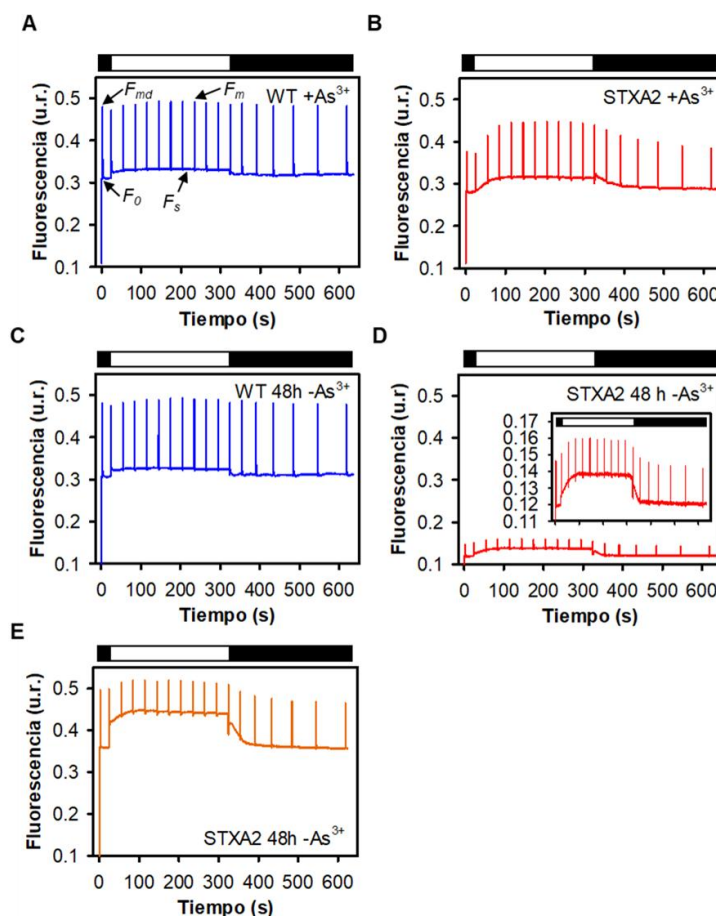


Figura 21. Curvas de inducción-recuperación en STXA2 con distintos niveles de TrxA. Se utilizaron células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia (0 horas) (A y B) y tras 48 horas sin inductor (C, D y E). Los cultivos se ajustaron a la misma concentración celular ($2 \cdot 10^7$ células \cdot ml $^{-1}$) en todos los casos excepto en E, que se ajustaron a la misma concentración de clorofila del WT ($2.5 \mu\text{g} \cdot$ ml $^{-1}$). Tras la adaptación a oscuridad durante 15 minutos, se expusieron a luz actínica de $50 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y posteriormente de nuevo a oscuridad. Durante la cinética se realizaron pulsos saturantes de $10.000 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 100 ms.

La diferencia relativa entre el NPQ_{osc} y el NPQ_{luz} calculada como $(NPQ_{osc} - NPQ_{luz})/NPQ_{luz}$ refleja la diferencia entre el estado *redox* del *pool* de PQ en oscuridad y en luz (Figura 22C). Se observa una gran diferencia en la estirpe STXA2 en presencia de inductor con respecto al WT, que puede estar relacionada con el aumento en la tasa



RESULTADOS

de transporte de electrones respiratorios en oscuridad. Sin embargo, la retirada del inductor permite observar una disminución a lo largo del tiempo en la estirpe STXA2, obteniéndose valores menores que en el WT después de 72 horas y que podrían deberse a varias situaciones, como cambios en el transporte de electrones respiratorios y fotosintéticos, limitaciones en los estados de transición además de cambios en la estequiometría o actividad del PSII o del PSI en luz.

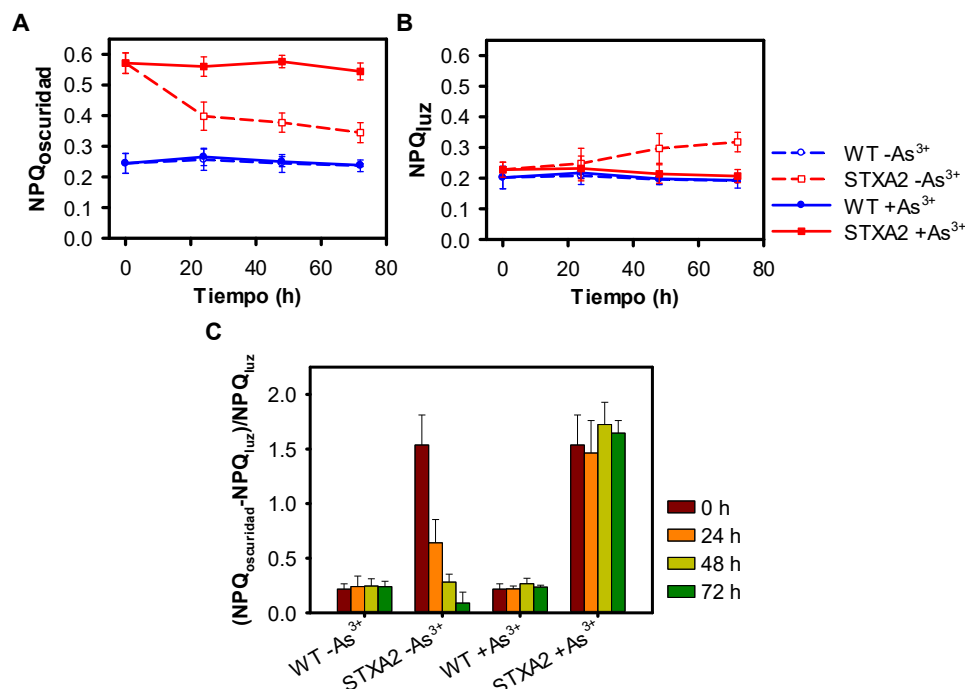


Figura 22. Respuesta NPQ dependiente del estado del pool de PQ. Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en condiciones estándar de crecimiento en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito, se ajustaron a $2 \cdot 10^7$ células \cdot ml⁻¹ y se sometieron a un pulso saturante tras 15 minutos en oscuridad (F_{md}) o un pulso saturante tras 5 minutos de iluminación con luz actínica roja (F_m). La fluorescencia máxima en presencia de DCMU F_{mDCMU} , junto a F_{md} y F_m , permiten calcular el NPQ en oscuridad (A) y en luz (B). El tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos. (C) Diferencias relativas entre el NPQ_{osc} y el NPQ_{luz} calculado a partir de los valores de A y B. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

La aplicación de pulsos de saturación en la cinética de inducción-recuperación permite obtener otros parámetros fotosintéticos utilizados ampliamente como la fluorescencia variable en luz [$(F_q) = (F_m - F_s)$] (Figuras 23A y 23B), que es el reflejo de los centros de reacción abiertos, o el rendimiento fotoquímico del PSII [$(Y_{II}) = (F_m - F_s) / F_m$] (Figura 23C). Ambos parámetros van en línea, y permiten analizar el flujo de electrones fotosintéticos. En la Figura 23A y 23B se muestra el parámetro F_q para las estirpes WT y STXA2, obtenidos durante la cinética de crecimiento en presencia y ausencia de arsenito. Las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor presentan valores de 0.155



RESULTADOS

y 0.125 respectivamente (Figura 23A). Las diferencias entre la estirpe WT y STXA2 en presencia de arsenito están relacionadas con los niveles de clorofila, que son menores en STXA2 incluso en presencia de inductor. De tal forma que cuando se utiliza la misma concentración de clorofila se obtienen valores similares al WT (Figura 23B). La retirada de arsenito del medio produce una disminución del valor de F_q a lo largo del tiempo (Figura 23A), probablemente debido a la disminución por célula de los complejos PSII y de la cantidad de clorofila. Cuando se analiza este valor partiendo de la misma concentración de clorofila, las diferencias en F_q son visibles después de 48 horas del cultivo sin inductor (Figura 23B).

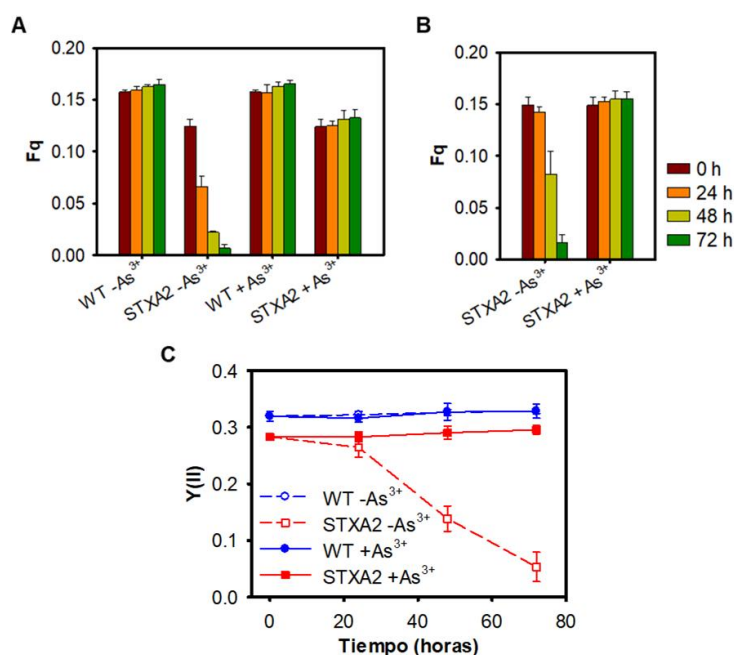


Figura 23. Niveles relativos de centros de reacción abiertos (F_q) y rendimiento del PSII ($Y(II)$) en luz en STXA2. (A) Fluorescencia variable en luz (F_q) obtenida como diferencia entre F_s y F_m . Ambos parámetros se obtuvieron durante las cinéticas de fluorescencia de la figura 21, donde F_s y F_m corresponden a los niveles de fluorescencia basal en luz actínica (F_s) y fluorescencia máxima (F_m) en el último pulso saturante antes de apagar la luz. (B) F_q obtenida en la estirpe STXA2 durante las cinéticas de fluorescencia utilizando la misma concentración de clorofila que la estirpe WT. (C) Rendimiento fotoquímico $Y(II)$ de WT y STXA2 en luz. Los parámetros obtenidos en A se utilizaron para el cálculo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

Es importante destacar que a diferencia de algas y plantas superiores, donde los parámetros F_q y $Y(II)$ están directamente relacionados con la asimilación de CO_2 , los electrones del PSII pueden ser utilizados en las cadenas de transporte de electrones fotosintético o respiratorio en las cianobacterias (Ogawa et al., 2013). Cuando se analiza el rendimiento del PSII en la estirpe STXA2 en presencia de inductor se observan diferencias con respecto al WT que indican una limitación en el lado aceptor del PSII



(Figura 23C). Tras la retirada del arsenito, la disminución del valor F_v no va acompañada de una pérdida del Y(II) en la estirpe STXA2 durante las primeras 24 horas, aunque presenta diferencias después de 48 horas, relacionadas posiblemente con la limitación en el ciclo de CBB, como hemos comentado anteriormente. (Figura 23C).

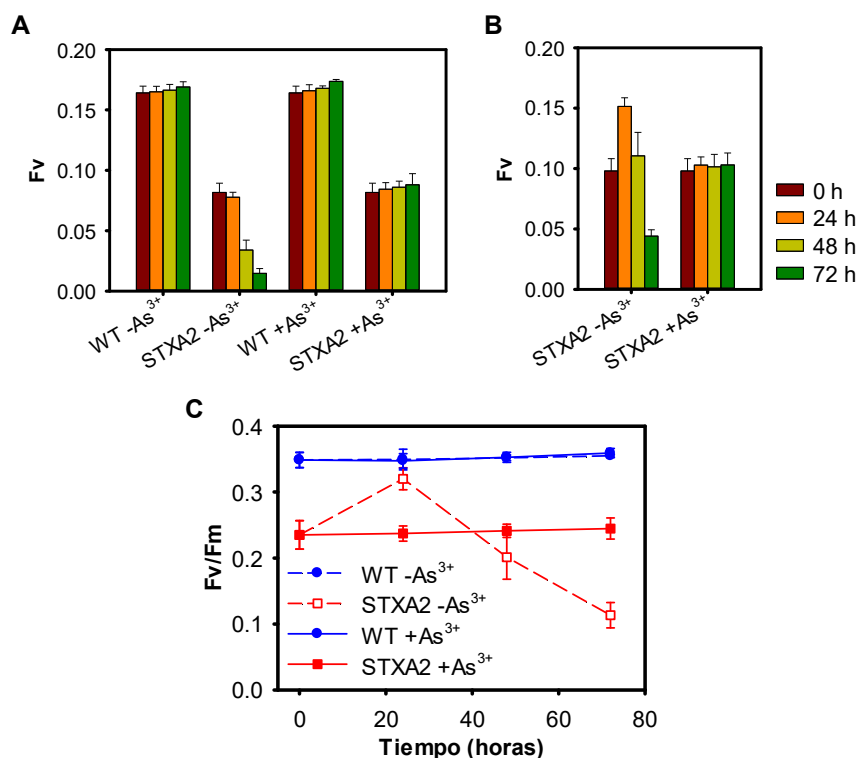


Figura 24. Niveles relativos de fluorescencia variable (F_v) y F_v/F_m en oscuridad en STXA2. (A) Fluorescencia variable en oscuridad (F_v) obtenida como diferencia entre F_0 y F_{md} . Ambos parámetros se obtuvieron durante las cinéticas de fluorescencia de la figura 21, donde F_0 y F_{md} corresponden a los niveles de fluorescencia basal en oscuridad (F_0) y fluorescencia máxima en oscuridad (F_{md}). (B) F_v obtenida en la estirpe STXA2 durante las cinéticas de fluorescencia con los mismos niveles de clorofila que la estirpe WT. (C) Eficiencia fotosintética (F_v/F_m) de WT y STXA2 adaptadas a oscuridad. Los parámetros obtenidos en A se utilizaron para el cálculo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

Otros parámetros como la fluorescencia variable en oscuridad [$(F_v)=(F_m-F_0)$] y el rendimiento asociado [$(F_v/F_m)=(F_m-F_0/F_m)$], también son indicativos de un estado II "más fuerte" en STXA2 y un *pool* de PQ más reducido. En la estirpe STXA2 se observan valores menores de F_v y F_v/F_m en presencia de inductor con respecto al WT (Figuras 24A y 24B), incluso al utilizar la misma concentración de clorofila. Al eliminar el inductor, la estirpe STXA2 presenta un valor menor de F_v y una disminución progresiva a lo largo del tiempo con respecto a la estirpe WT (Figura 24A). Cuando se utiliza la misma concentración de clorofila, se observa un aumento de F_v tras 24 horas sin inductor y una



RESULTADOS

disminución progresiva de nuevo (Figura 24B), que se relaciona con los valores de F_v/F_m obtenidos (Figura 24C). El aumento de F_v y el de F_v/F_m después de 24 horas de la eliminación del inductor, pueden estar relacionados con cambios en los componentes de transporte de electrones y en los flujos a través de la cadena de transporte de electrones.

La monitorización del incremento de la fluorescencia tras la iluminación, se utiliza como una medida de la tasa de transporte de electrones cíclico (CET) a través del NDH-1 (Holland et al., 2015; Mi et al., 1995, 2000). Recientemente, se ha descrito un segundo aumento post-iluminatorio dependiente también del NDH-1 y relacionado con la acumulación de intermediarios metabólicos en luz (Xu et al., 2016). Por ello, se analizó la cinética post-iluminatoria que se produce tras el periodo de luz en la estirpe STXA2 en presencia y ausencia de arsenito. Como se muestra en la Figura 25A, la estirpe WT presenta un aumento post-iluminatorio pequeño y transitorio (P1) debido al CET. Posteriormente se observa otro pequeño aumento de la fluorescencia después de 20 segundos (P2) que se ha relacionado con la oxidación de azúcares producido en luz debido al ciclo de CBB, que reducen NADP+ con una transferencia de electrones posterior al *pool* de PQ vía NDH-1 (Holland et al., 2015; Xu et al., 2016). A diferencia de esto, en la estirpe STXA2 en presencia de arsenito se observa un pico P1 bien diferenciado y que supera la fluorescencia basal presente en luz (Figura 25A). También se observa el segundo aumento post-iluminatorio P2, aunque ligeramente desplazado en el tiempo con respecto a la estirpe WT (Figura 25A). Esto muestra un mayor flujo de electrones hacia el *pool* de PQ a través del CET y de la actividad catabólica. La estirpe STXA2 tras 48 horas sin arsenito, presenta un amplio pico postiluminatorio (P1), sin llegar a distinguirse un segundo pico (Figura 25). En esta estirpe, el mayor nivel de F_s que se alcanza respecto al F_o (Figura 21), es responsable de la mayor disminución de la fluorescencia en oscuridad inmediatamente después de apagar la luz.

Para analizar la posible limitación en el ciclo de CBB en la estirpe STXA2 se utilizó un inhibidor de este ciclo ampliamente utilizado como es el glicolaldehído (GA), que inhibe a la enzima fosforibuloquinasa (PRK) (Takahashi y Murata, 2005). La adición de GA inmediatamente antes del inicio de las medidas permite observar en la estirpe WT un único aumento post-iluminatorio (P1) y más amplio con respecto al observado en ausencia de GA (Figura 25B). Este P1 está relacionado con el CET generado directamente a partir de los electrones procedentes del PSI. En el caso de la estirpe STXA2 con arsenito se observa un resultado similar a la estirpe WT. En ninguna de las dos estirpes se observa un segundo aumento post-iluminatorio (P2) tras la adición de GA posiblemente debido a que ya no se generan intermediarios del ciclo de CBB. Respecto a la estirpe STXA2 sin arsenito, no se observan apenas diferencias con



RESULTADOS

respecto a la cinética sin GA. Estos resultados ponen de manifiesto una limitación, a diferentes niveles, en la activación del ciclo de CBB en la estirpe STXA2 con bajos niveles de TrxA.

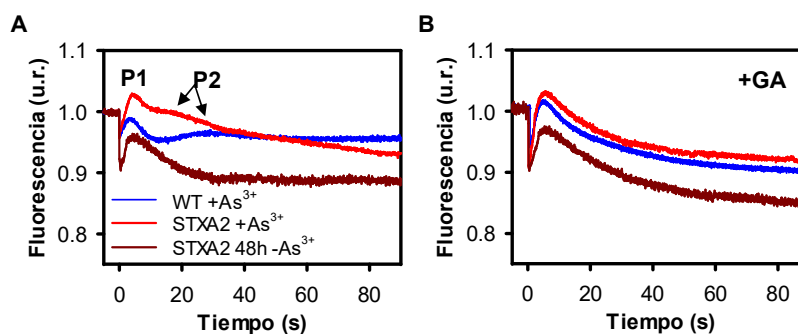


Figura 25. Medida del incremento de la fluorescencia tras finalizar la iluminación en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (0 horas) y tras 48 horas sin arsenito, se ajustaron a $2 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ y se utilizaron para el análisis de la fluorescencia en ausencia (A) y en presencia de 10 mM de GA (B). Las células se adaptaron a una luz actínica roja ($50 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durante 5 minutos, y se realizó un seguimiento del incremento transitorio de la fluorescencia tras apagar la luz. El nivel F_s corresponde a la fluorescencia inmediatamente antes de finalizar la luz actínica y se normalizó a 1. La adición de 10 mM GA se realizó inmediatamente antes de la adaptación a 15 minutos de oscuridad.

Finalmente, se evaluaron los cambios en la fluorescencia en presencia de luz azul, que excita preferentemente al PSI y que nos permiten determinar los cambios de transición de estado. Los resultados se muestran en la Figura 26 donde se observa que en presencia de arsenito las estirpes WT y STXA2, al iluminar el cultivo con luz azul después de 15 minutos en oscuridad se produce un incremento en la fluorescencia máxima definida para luz azul como F_{ma} (Figuras 26A y 26B). El cambio a luz roja, que excita preferentemente a las ficobiliproteínas, induce una disminución en la fluorescencia máxima (F_m) también en ambas estirpes (Figuras 26A y 26B). El estado estable de la F_m en el caso del WT es similar a la F_{md} , mientras que la estirpe STXA2 presenta un F_m mayor que el F_{md} , debido a su “fuerte” estado II en oscuridad comentado anteriormente. De esta forma, la estirpe WT presenta un estado *redox* del *pool* de PQ similar en luz roja y en oscuridad, mientras que la estirpe STXA2 presenta un *pool* más reducido en oscuridad con respecto a la luz azul (Figura 26A). A pesar de esto, la estirpe STXA2 lleva a cabo las transiciones de estado sin limitaciones aparentes. La disminución de los niveles de TrxA dificulta las transiciones de estado, de tal forma que estas prácticamente no se observan tras 48 horas sin inductor (Figura 26B). Estos datos corroboran la caída del Y(II) obtenida en esta estirpe independiente de la calidad de la luz (Figura 23C).



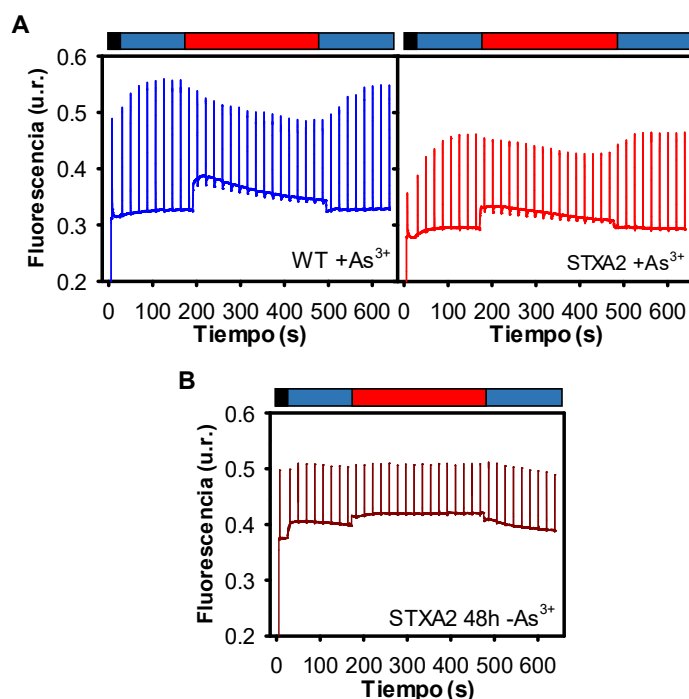


Figura 26. Medida de los estados de transición en STXA2 con distintos niveles de TrxA. Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de inductor (0 horas) (A) y tras 48 horas sin arsenito (B) se utilizaron para el análisis de la fluorescencia. Tras adaptarse a oscuridad durante 15 minutos, se expusieron a luz actínica azul de $40 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, posteriormente a una luz actínica roja de $40 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y finalmente de nuevo a luz actínica azul. Durante la cinética se realizaron pulsos saturantes de $10.000 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de 100 ms. Las células de WT y STXA2 con inductor se ajustaron a $2 \cdot 10^7$ células $\cdot \text{ml}^{-1}$ en A y las células de STXA2 con 48 horas sin arsenito se ajustaron a la misma concentración de clorofila que la estirpe WT ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) en B.

Para complementar los estudios fotosintéticos realizados con Dual PAM-100, se utilizó un electrodo de Clark para determinar la evolución de oxígeno. Para ello, $2 \cdot 10^7$ células $\cdot \text{ml}^{-1}$ de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en presencia del inductor (0 horas) y después de la retirada del mismo (24, 48 y 72 horas) se expusieron a la misma intensidad lumínica que la utilizada en nuestras condiciones de crecimiento ($50 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) durante 15 minutos. En presencia de inductor, la estirpe WT presenta una tasa de producción de oxígeno de $2.08 \pm 0.18 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mientras que la estirpe STXA2 alcanza una tasa de $1.63 \pm 0.15 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figura 27A). La retirada del inductor produce en la estirpe STXA2 una disminución en la tasa de producción de oxígeno que representa el 88% aproximadamente después de 48 horas ($0.20 \pm 0.04 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) con respecto a los valores iniciales (Figura 27A).



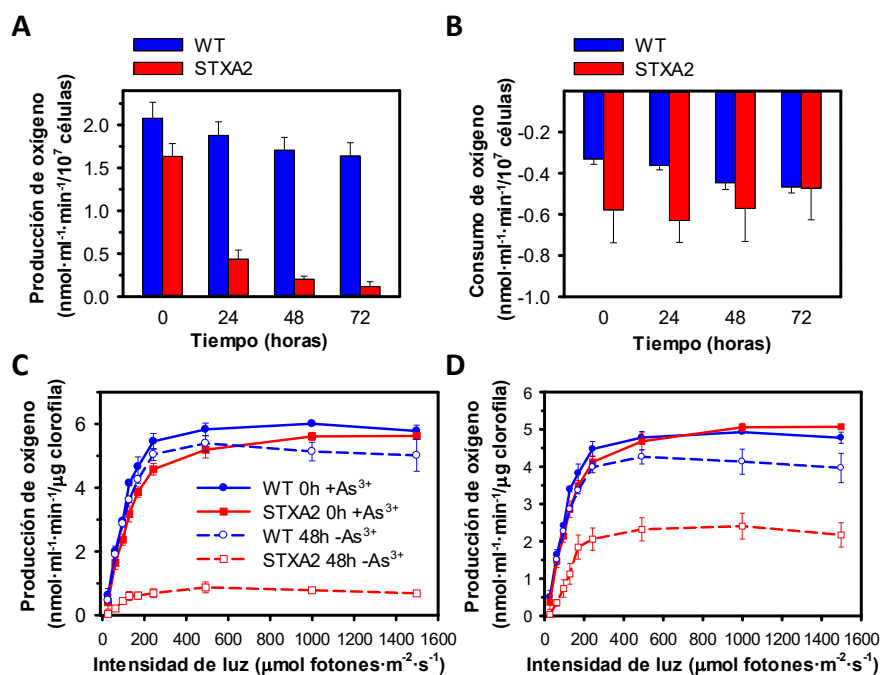


Figura 27. Evolución de oxígeno en las estirpes WT y STXA2. (A) Determinación de la producción de oxígeno en condiciones de luz de crecimiento. Las células de las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito y después de la retirada del mismo se ajustaron a una concentración celular de 2.10^7 células· ml^{-1} **(B)** Determinación del consumo de oxígeno en oscuridad. Se utilizaron las mismas condiciones que en el apartado (A). **(C y D)** Determinación de la producción de oxígeno en diferentes intensidades lumínicas. Las células se ajustaron a la misma concentración celular (2.10^7 células· ml^{-1}) en C y a la misma concentración de clorofila ($2.5 \mu g \cdot ml^{-1}$) en D antes de las medidas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

El análisis de la tasa respiratoria de las estirpes en las mismas condiciones descritas y tras 15 minutos de oscuridad indica que la estirpe STXA2 tiene una tasa de consumo de oxígeno mayor que la estirpe WT ($0.58 \pm 0.16 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ frente a $0.33 \pm 0.03 \text{ nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Figura 27B). Este resultado podría estar relacionada con las diferencias observadas anteriormente en el Dual PAM-100, donde se observa un *pool* de PQ más reducido en oscuridad (Figura 21A). La retirada del inductor del medio no produce cambios en la tasa respiratoria de esta estirpe STXA2 con respecto al WT durante una cinética estándar de 72 horas (Figura 27B). Este resultado, junto con los obtenidos mediante el PAM, permiten asociar a TrxA principalmente con la maquinaria fotosintética y el LET.

Por otro lado, se realizaron curvas de saturación para analizar la respuesta de la producción de O_2 en la estirpe STXA2 a intensidades de luz crecientes (Figuras 27C y 27D). Las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito presentan tasas de producción de oxígeno similares cuando se someten a intensidades lumínicas elevadas, aunque la



estirpe WT alcanza la tasa máxima a una intensidad de 500 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mientras que la estirpe STXA2 lo hace a 1000 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 27C). En la estirpe STXA2, la retirada del inductor provoca una disminución drástica en la tasa de producción de oxígeno en las distintas intensidades lumínicas (Figura 27C). Para analizar si los cambios observados se deben a las diferencias en los niveles de clorofila y ficobiliproteínas que presenta la estirpe STXA2 con respecto al WT, se realizaron curvas de saturación con una concentración de clorofila similar (Figura 27D). Las diferencias en la tasa de producción de oxígeno entre las estirpes WT y STXA2 en presencia del inductor son pequeñas y debidas a las pequeñas diferencias en los pigmentos y posiblemente en los complejos fotosintéticos (Figura 27D). En estas condiciones la tasa de producción de oxígeno aumenta en la estirpe STXA2 en ausencia del inductor, aunque sigue siendo menor que la estirpe STXA2 con arsenito (Figura 27D). Estos resultados ponen de manifiesto que la estirpe STXA2 en ausencia de inductor, es decir con bajos niveles de TrxA, presenta alteraciones que puedan afectar a distintos procesos celulares más allá de la actividad fotosintética.

2.2 Efectos sobre el fotosistema I

Para completar el análisis fotosintético de la estirpe STXA2 se analizó cómo puede afectar a la actividad del PSI los bajos niveles de TrxA. Para determinar la actividad del PSI (P700) hay que tener en cuenta que la forma oxidada de P700 presenta un máximo de absorbancia en torno a 830 nm, por lo que es posible analizar cambios en el estado *redox* de P700 analizando las diferencias entre 830-875 nm (Klughammer y Schreiber, 1994). Las cianobacterias en oscuridad presentan un P700 en estado reducido y un ciclo de CBB inactivo. En el panel A de la Figura 28 se muestra la cinética de oxidación/re-reducción del P700 en la estirpe WT. La aplicación de una luz roja lejana o FR (730 nm) es absorbida preferentemente por los pigmentos del PSI que se oxida tras reducirse la Fd. Posteriormente, el PSI se reduce de nuevo por el CET y por el NAD(P)H generado en las vías catabólicas. Debido a esto, el máximo nivel de oxidación (P_m) e indicativo de la capacidad máxima del PSI, se obtiene tras aplicar un pulso saturante de luz roja o PS (635 nm) en presencia de luz FR. En estas condiciones se alcanza la oxidación completa del PSI antes de que los electrones del CET o PSII causen la re-reducción (Figura 28).

El análisis mediante cinéticas rápidas de P700 permite observar como la iluminación con luz FR tras adaptación de 15 minutos a oscuridad, produce un incremento en la absorbancia a 830 nm (estado estable P700*) que es menor en la estirpe STXA2 en presencia de inductor con respecto a la estirpe WT (Figura 28A). En ausencia de inductor, la estirpe STXA2 con respecto al WT también presenta un menor



RESULTADOS

incremento en esta absorbancia a 830 nm. Esta diferencia es debida a un mayor flujo de electrones hacia el PSI desde el CET y las vías catabólicas.

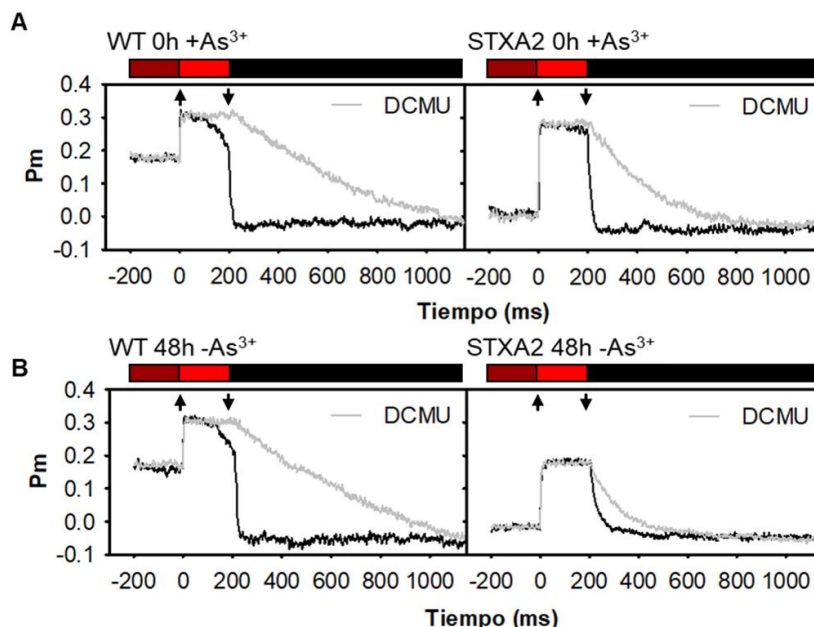


Figura 28. Cinética rápida de pulso corto de P700 en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. Las células de las estirpes WT y STXA2 en presencia (A) y ausencia (B) de arsenito se adaptaron 15 minutos a oscuridad y se les aplicó una luz FR (730 nm durante 20 segundos). Inmediatamente antes de finalizar la luz FR, se les aplicó un PS (635 nm, 10.000 μ moles fotones \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ y 200 milisegundos). Las células se ajustaron a la misma concentración celular ($4 \cdot 10^7$ células \cdot ml⁻¹) excepto la estirpe STXA2 tras 48 horas sin arsenito, que se ajustó a la misma concentración de clorofila que la estirpe WT (5μ g \cdot ml⁻¹).

La aplicación posterior de un PS de 200 ms inmediatamente antes de finalizar los 20 segundos de luz FR (indicado por flechas), permite obtener el parámetro P_m. La señal obtenida tras finalizar dicho pulso se corresponde con P700 completamente reducido y depende de los electrones procedentes del LET y las vías alternativas (Figura 28). Además, la determinación del P_m permite establecer una relación entre la cantidad de clorofila y la capacidad máxima de PSI, complejo que contiene más del 80% de clorofilas y más del 75% de carotenos (Fujita et al., 1994). La cinética de seguimiento del P_m de la estirpe STXA2 en presencia de arsenito indica que el nivel de TrxA en esta estirpe es suficiente para mantener una capacidad máxima del PSI cercana al WT (85% aproximadamente) (Figura 28A y 29A). Sin embargo, la disminución progresiva de TrxA, tras la retirada del arsenito del medio, da lugar a una pérdida sustancial de esa capacidad máxima (Figura 28B y 29A). El análisis del valor P_m de la estirpe STXA2 con la misma cantidad de clorofila que la estirpe WT permite observar diferencias a partir de



las 48 horas, indicando deterioro o fotoinactivación parcial en el complejo PSI cuando la estirpe presenta niveles inferiores al 2% de TrxA (Figura 29B).

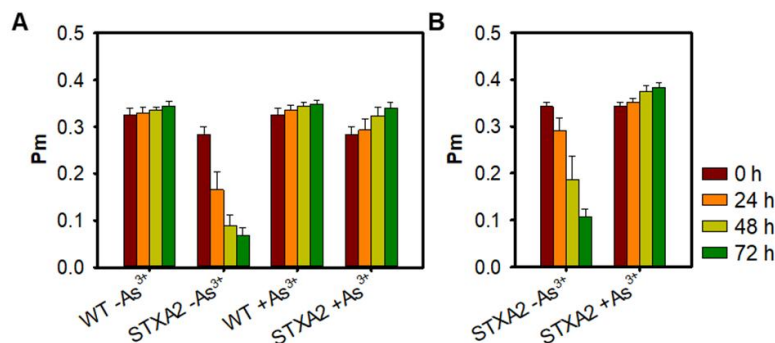


Figura 29. Cantidad máxima fotooxidable de P700 en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en ausencia y en presencia de arsenito se ajustaron a $4 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ y se utilizaron para el cálculo de la cantidad máxima fotooxidable del PSI (P_m) como se describe en la Figura 28. (B) P_m obtenido en la estirpe STXA2 en las mismas condiciones descritas en A pero ajustando a la misma concentración de clorofila de la estirpe WT ($5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). El tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

La cinética de oxidación/re-reducción del PSI que se muestra en la Figura 28 también permite analizar la activación del LET. Durante el PS, en la estirpe WT se observa una primera re-reducción del PSI debida a los electrones procedentes del PSII, que se inicia tras 50 milisegundos. La estirpe STXA2 en presencia de inductor solo permite observar una pequeña disminución (Figura 28A), mientras que después de 48 horas sin inductor no se observa ninguna re-reducción (Figura 28B). La utilización de DCMU (inhibidor del LET desde el PSII) corrobora la participación de PSII en esta re-reducción (Figuras 28A y 28B). La presencia y velocidad de esta re-reducción se han relacionado con un mejor acoplamiento entre fotosistemas (Schwarz et al., 2013), aunque también puede deberse a un retraso en la activación del PSII o incluso a las FLV. Estas proteínas también parecen actuar como sumidero de electrones en el PSI y estar relacionadas con una mayor fotooxidación del PSI en presencia de luz.

Finalmente, la re-reducción obtenida tras apagar la luz FR y finalizar el PS es dependiente de los electrones procedentes del PSII. De tal forma que es muy rápida en ausencia de DCMU y muy lenta tras su adición en la estirpe WT (Figuras 28A y 28B). En la estirpe STXA2 en presencia de inductor se observan diferencias con respecto al WT, que implican una re-reducción más lenta sin DCMU y más rápida con DCMU. En ausencia de inductor, la re-reducción se hace aún más lenta sin DCMU y más rápida en presencia de DCMU (Figura 28B).



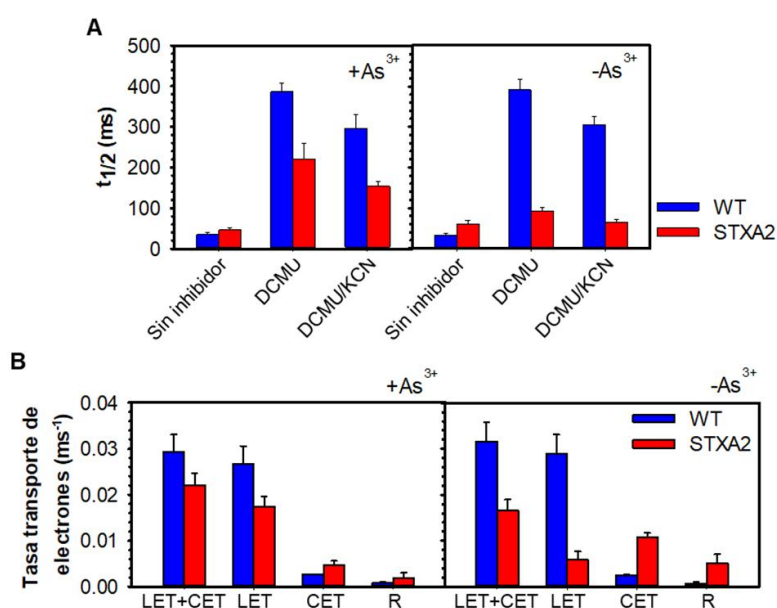


Figura 30. Transporte de electrones fotosintético en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Tiempo medio ($t_{1/2}$) de la re-reducción de P700⁺. Las células WT y STXA2 cultivadas en presencia de arsenito (0 horas) y tras 48 horas sin arsenito se ajustaron a una concentración de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila. Tras adaptarse a oscuridad durante 15 minutos, se iluminaron durante 30 segundos con luz actínica (100 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las estirpes se midieron en ausencia y en presencia de 20 μM DCMU y 20 μM DCMU + 1 mM KCN. **(B)** Tasas de transporte de electrones en WT y STXA2 determinadas a partir de A. LET representa el flujo lineal de electrones, CET representa el flujo cíclico de electrones y R representa el flujo de electrones hacia oxidasas terminales. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

Los niveles bajos de TrxA en la estirpe STXA2 en presencia de inductor, permiten el crecimiento, aunque con un retraso del 30% respecto al WT en fase exponencial, como se ha referido anteriormente. Esto implicaría la necesidad de un reajuste en el metabolismo y en el flujo de electrones. Para cuantificar el flujo lineal y el flujo cíclico de electrones, así como el transporte a las oxidasas terminales, se analizaron las tasas de re-reducción de PSI en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor y tras iluminación. Estas medidas se llevaron a cabo en presencia o ausencia de inhibidores: DCMU y KCN (inhibe la vía respiratoria). Estos inhibidores permiten distinguir el flujo de electrones del CET con el flujo hacia las oxidasas terminales. Los detalles de las determinaciones se describen en el apartado III.4.2.2. Como se observa en la Figura 30, en ausencia de inhibidores el tiempo medio de re-reducción de la estirpe WT es más rápido que en la estirpe STXA2 en presencia de arsenito y más lento en presencia de DCMU y DCMU/KCN (Figura 30A). Después de 48 horas sin inductor también se observa este efecto, aunque con diferentes tiempos. Cuando se calculan las tasas de flujo lineal y cíclico (LET y CET), así como la tasa de flujo respiratorio a



RESULTADOS

COX/Cyd (R) en las distintas condiciones (Figura 30B), se observa que en la estirpe STXA2 con inductor, el LET es un 30% menor, reduciéndose de manera considerable tras 48 horas sin inductor con respecto al WT. Sin embargo, se observa un aumento en el CET y en las vías respiratorias cuando disminuyen los niveles de TrxA (Figura 30B). El aumento del flujo a través del CET podría deberse a una limitación en el ciclo de CBB y un aumento en el NADPH, que dona los electrones al *pool* de PQ y genera un aumento en la tasa de re-reducción de P700+ ($t_{1/2}$). Esta acumulación podría deberse a la limitación en el ciclo de CBB.

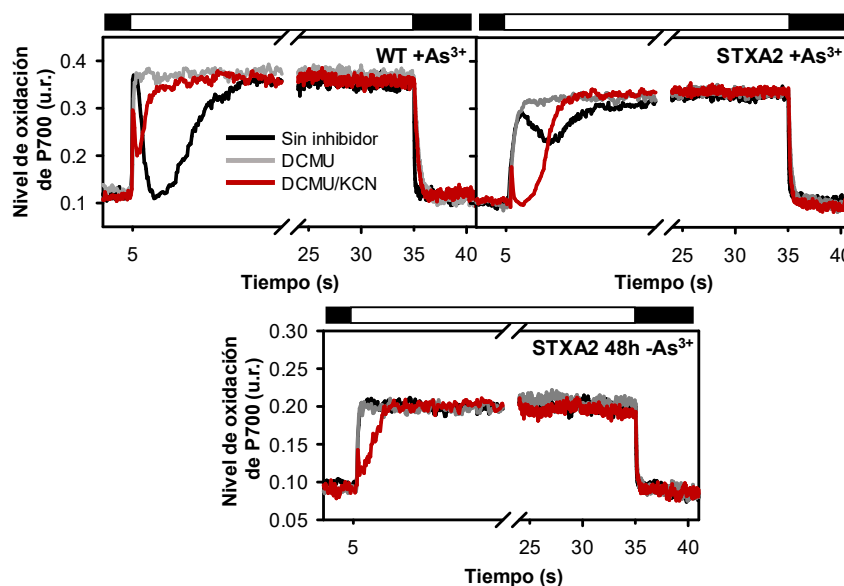


Figura 31. Cinética de oxidación-reducción de P700 en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. Cambios en el estado de P700 tras la iluminación de las células, como se describe en la Figura 30.

Además de cuantificar el transporte de electrones a partir de las re-reducciones del P700, la exposición con luz actínica permitió también observar diferencias en la oxidación de P700 como se observa en la Figura 31. Tras la oxidación inicial, en la estirpe WT se observa una reducción transitoria que refleja la donación de electrones desde PSII, CET y/o la vía respiratoria, combinado con una reducción completa de los aceptores del PSI reducidos. En la estirpe STXA2 con arsenito, al contrario de lo esperado, esta reducción transitoria es menor, mientras que desaparece tras 48 horas sin arsenito en el medio. Estos datos sugieren que las oxidasas terminales podrían competir con el PSI por los electrones, siendo una válvula en la estirpe mutante con arsenito, la caída de TrxA por debajo del 2% conduce a una disminución en el flujo de electrones procedentes del PSII, la aplicación de DCMU a las muestras hace desaparecer esta reducción transitoria en todos los casos, y la aplicación posterior de



KCN genera de nuevo una reducción transitoria que ahora resulta ser mayor en el mutante STXA2 en presencia de arsenito e incluso en su ausencia, debido al mayor flujo de electrones hacia las oxidasas terminales, que ahora se dirigen hacia el PSI (Figura 31).

2.3 Medidas del *pool* de NADPH en STXA2 con distintos niveles de TrxA

Una herramienta utilizada para analizar los cambios *in vivo* en la relación NADP⁺/NADPH es la medida de la fluorescencia azul-verde mediante el Dual PAM-100 (Cerovic et al., 1993; Mi et al., 2000). La medida de esta fluorescencia muestra analogías con la medida de la fluorescencia de la clorofila debido al acoplamiento entre el transporte de electrones y la generación de NADPH (Holland et al., 2015). En base a los resultados obtenidos anteriormente, teniendo en cuenta que los cambios producidos en el lado aceptor del PSI pueden influir en el funcionamiento del flujo de electrones, se determinó la fluorescencia de NADPH en la estirpe STXA2. Además, algunas enzimas del ciclo de CBB se han identificado como posibles proteínas diana de TrxA en diferentes organismos fotosintéticos (Zaffagnini et al., 2018).

Para ello, se utilizó el módulo NADPH/9-AA (excitación 365 nm, emisión 420-550 nm) del Dual PAM-100 (ver detalles en el apartado III.4.4), y los inhibidores DCMU y GA que inhiben el LET y el ciclo de CBB respectivamente. Las estirpes WT y STXA2 se adaptaron a 15 minutos de oscuridad y se iluminaron durante 5 minutos con luz actínica (620 nm, 50 μ moles fotones·m⁻²·s⁻¹). Esta iluminación induce un aumento en la fluorescencia incluso en la estirpe STXA2 después de 48 horas sin inductor, que implica la producción de NADPH dependiente de luz (Figura 32). La adición de DCMU a las estirpes pone de manifiesto la relación directa entre el flujo de electrones del LET y la reducción inicial del NADP⁺ debido a que no se observa ningún cambio significativo en la fluorescencia (Figura 32).

En luz y con un ciclo de CBB completamente activo, la fluorescencia en la estirpe WT comienza a disminuir (t~60 s) hasta alcanzar un equilibrio entre el NADPH generado por la fotosíntesis y el consumo de NADPH (t~120 s) (Figura 32). La adición de GA produce un aumento general en la fluorescencia debido al bloqueo en el ciclo de CBB. En la estirpe STXA2 con arsenito se observa mayores niveles de fluorescencia con respecto al WT que se mantienen en presencia de GA (Figura 32). Un comportamiento similar se observa en la estirpe STXA2 sin arsenito, además de no observar diferencias entre la ausencia y presencia de GA.



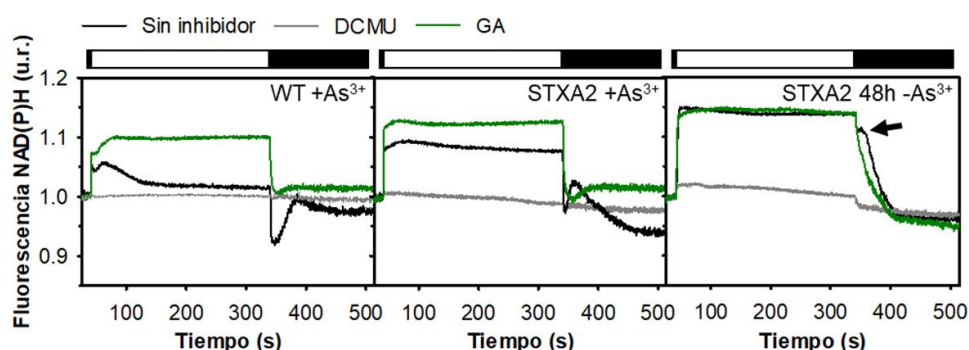


Figura 32. Cinética de fluorescencia de NAD(P)H en STXA2 con distintos niveles de TrxA. Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (0 horas), y la estirpe STXA2 tras 48 horas sin arsenito, se ajustaron a $2 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ y se utilizaron para analizar cambios en la fluorescencia de NAD(P)H. Tras adaptarse a oscuridad durante 15 minutos, se expusieron a luz actínica de 50 μ moles fotones·m⁻²·s⁻¹ durante 300 s. La fluorescencia inicial antes de encender la luz se normalizó a 1 para facilitar la comparación. Los inhibidores DCMU (10 μ M) y GA (10 mM) se añadieron antes del periodo de oscuridad.

En oscuridad también observamos diferencias interesantes. Las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor presentan una fuerte disminución en la fluorescencia debido al cese del LET y a que las rutas de oxidación del NADPH todavía están activas, aunque con diferencias en el tiempo medio (Figura 32). Mientras que la estirpe WT presenta un tiempo medio de caída de la fluorescencia de 212.67 ± 18.90 s, en la estirpe STXA2 es de 327.66 ± 71.69 s. Además, las estirpes WT y STXA2 con arsenito presentan un aumento transitorio de la fluorescencia en la oscuridad, que en el caso del WT alcanza su máximo tras 45 s, y en el caso de STXA2 tras 20 s (Figura 32). El aumento de la fluorescencia en oscuridad relacionado con el incremento de azúcares reducidos en el ciclo de CBB. Estos producen NADPH transitoriamente que se oxida a través del CET y de las vías respiratorias (Holland et al., 2015; Xu et al., 2016). Respecto a la estirpe STXA2 sin inductor, se observa una lenta disminución de la fluorescencia dividida en dos fases. Una fase rápida inicial y una segunda fase, que se inicia después de un pequeño aumento en la fluorescencia (Figura 32, marcada con una flecha).

En las estirpes WT y STXA2 con inductor, la presencia de GA permite observar un aumento en el tiempo medio de caída de la fluorescencia debido a que el NADPH se oxida principalmente en el ciclo de CBB, siendo este de 8 s aproximadamente en ambas estirpes. A diferencia de esto, en la estirpe STXA2 sin inductor se observa una disminución continua de la fluorescencia con respecto a las medidas en ausencia de inhibidor (Figura 32).

Estas observaciones permiten establecer una relación entre un retraso en la activación y/o una limitación en la capacidad de oxidar NADPH a través del ciclo de CBB



debido a los bajos niveles de TrxA. De esta forma, la estirpe STXA2 parece presentar una mayor afluencia de electrones hacia el CET debido al NADPH y a los azúcares reducidos acumulados en luz. La situación observada en la estirpe STXA2 sin inductor es posiblemente debida a una gran afluencia de NADPH acumulado en luz hacia la vía NDH-1 y PQ.

2.4 La cantidad de TrxA en la estirpe STXA2 afecta a los niveles intracelulares de ATP

La identificación de dos subunidades de la ATPasa como posibles dianas de TrxA (Mata-Cabana et al., 2007), nos llevó a analizar los niveles de ATP en la estirpe STXA2. Para ello se midió de manera indirecta la generación de ATP mediante el uso del colorante amarillo de acridina (AY). Esta técnica se basa en el aumento de la fluorescencia durante la iluminación actínica que debido a la alcalinización del citosol y a la acidificación simultánea del lumen tilacoidal, provoca la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa (ver detalles en el apartado III.4.3).

Inicialmente, la iluminación produce un aumento en la fluorescencia en todos los casos hasta alcanzar un estado estable (Figura 33). El tiempo necesario hasta alcanzar este estado estable en el caso de la estirpe WT es de 15.86 ± 0.87 s frente a 19.71 ± 1.92 s en la estirpe STXA2 en presencia de inductor. Sin embargo, la estirpe STXA2 tras 48 horas sin inductor presenta un tiempo medio muy largo (73.34 ± 13.63 s) (Figura 33B). Además, esta estirpe presenta un periodo inicial de unos 20 s aproximadamente, en el que la fluorescencia disminuye (Figura 33A). Estos cambios se asocian con el transporte de electrones a través del aparato fotosintético. La generación del ΔpH en la estirpe mutante STXA2 en ausencia de inductor puede ser debido principalmente a un aumento del CET y en menor medida al LET que todavía presenta. Tras el aumento en la fluorescencia se alcanza un estado estable debido al balance entre el ΔpH generado, la síntesis de ATP y su posterior utilización en el ciclo de CBB u otras rutas. Los datos obtenidos nos permiten calcular la amplitud definida como $\Delta P/P_0 [(P-P_0)/P_0]$, donde P_0 representa la fluorescencia antes de encender la luz actínica y P la fluorescencia estable en luz actínica. Esta amplitud es ligeramente mayor en la estirpe STXA2 con arsenito respecto al WT (0.47 ± 0.08 frente a 0.41 ± 0.03) (Figura 33A). Tras 48 horas sin inductor, la estirpe STXA2 tiene una relación $\Delta P/P_0$ menor (0.36 ± 0.12) después de 48 horas (Figura 33A). A pesar de esto, no podemos descartar que los cambios que presenta la estirpe STXA2 sin inductor sean debido a otro tipo de transferencia de protones a través de las membranas, que pueden interferir en las mediciones.

Curiosamente, las estirpes se comportan de forma diferente después de finalizar la luz actínica (Figura 33A). La estirpe WT presenta una caída en la fluorescencia,



RESULTADOS

seguido de un aumento transitorio que alcanza el máximo de fluorescencia después de 50 segundos de la finalización de la luz (Figura 33A). Por otro lado, la estirpe STXA2 en presencia de inductor presenta este aumento transitorio inmediatamente después de apagar la luz. Este aumento post-iluminatorio está relacionado directamente con el CET (Teuber et al., 2001) que es mayor en esta estirpe mutante. Además, el tiempo de generación del ΔpH estaría en consonancia con una baja actividad en el transporte de electrones, principalmente en STXA2 después de la retirada de inductor.

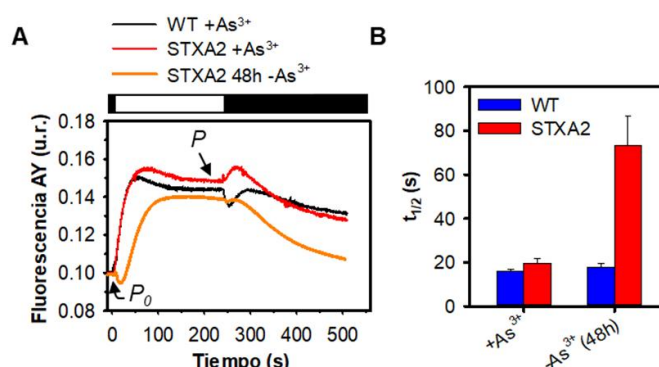


Figura 33. Cinética de formación de ΔpH a través de las membranas tilacoidales en WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Las células WT y STXA2 cultivadas en presencia de arsenito (0 horas), y STXA2 tras 48 horas sin arsenito, se ajustaron a $40 \cdot 10^7$ células y se utilizaron para analizar cambios en la fluorescencia del amarillo de acridina (AY). Tras adaptarse a oscuridad durante 15 minutos, se expusieron a luz actínica ($50 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante 250 s). La fluorescencia inicial (P_0) antes de encender la luz se normalizó a 0.1 para facilitar la comparación. (B) El tiempo medio para alcanzar la fluorescencia máxima desde el inicio de la fluorescencia se calculó mediante OriginPro 8. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Relacionado con lo anterior, los cambios en la cadena de transporte de electrones y la consiguiente generación de un ΔpH debe reflejarse en cambios en los niveles de ATP en la célula. Utilizando las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento y en presencia y ausencia de inductor, se analizaron los niveles de ATP, ADP y AMP. Los resultados se muestran en la Figura 34.

La estirpe STXA2, con niveles del 10% de TrxA, presenta una concentración de ATP mayor (20% aproximadamente) y similar de ADP y AMP a la obtenida en el WT en términos generales a lo largo de la cinética (Figuras 34A, 34B y 34C). Un mayor flujo de electrones hacia el CET parece podría estar relacionado con este resultado. La disminución en los niveles de TrxA en STXA2 tras retirar el inductor genera una fuerte caída en los niveles de ATP (Figura 34A), evidenciando un fuerte desequilibrio entre la tasa de generación de ATP y la tasa de consumo de ATP. Esta fuerte caída no se observa en el caso del ADP y del AMP (Figuras 34B y 34C).



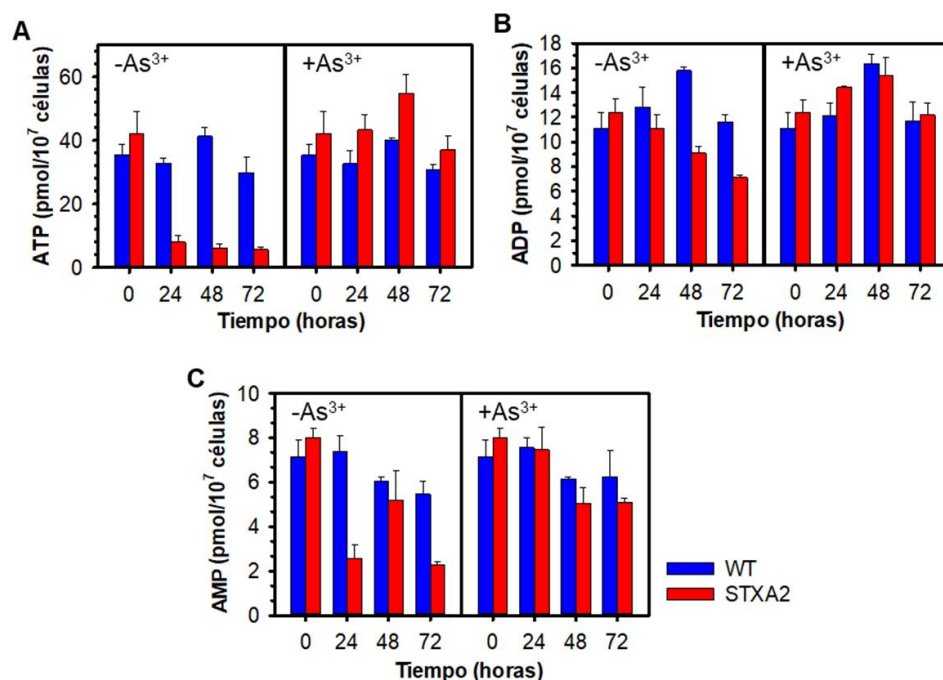


Figura 34. Medida de los niveles de ATP, ADP y AMP en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. 10⁷ células·ml⁻¹ de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en ausencia y en presencia de 1 mM arsenito (el tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos), se utilizaron para cuantificar los niveles de los nucleótidos ATP (A), ADP (B) y AMP (C) mediante HPLC. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

A partir de los datos obtenidos en la Figura 34 se determinó la carga energética de las células (Atkinson, 1968), que refleja el estado energético y metabólico de las células según los niveles del *pool* de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP). En la estirpe STXA2, la fuerte caída en los niveles de ATP, va acompañada de una disminución en la carga energética (Figura 35A), que estaría relacionada con el crecimiento y la utilización del carbono generado tras la fotosíntesis, que parece estabilizarse tras 48 horas. Por último, esta disminución en la carga energética en STXA2 va acompañada de una caída en el *pool* total de nucleótidos de adenina como se observa en la Figura 35B. La disminución en el *pool* total de nucleótidos parece indicar la existencia de limitaciones en el metabolismo del carbono, que podrían limitar a su vez la síntesis de *novo* de nucleótidos, como se ha descrito en un mutante que carece del regulador transcripcional RpaA (Puszynska y O'Shea, 2017).



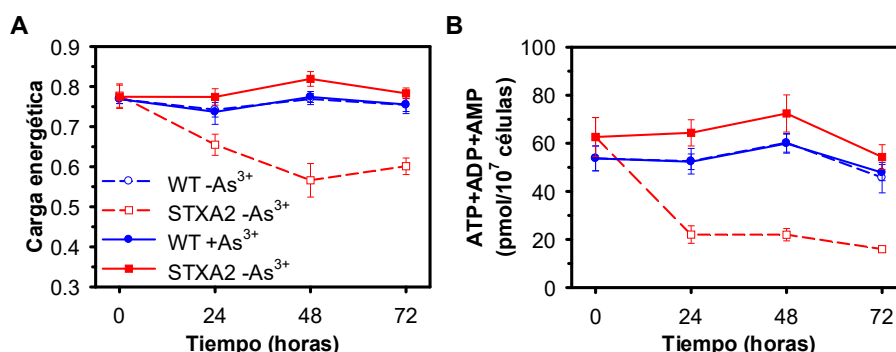


Figura 35. Carga energética celular y niveles totales de nucleótidos de adenina en WT y STXA2. (A) La carga energética definida como $(ATP+ADP*0.5)/(ATP+ADP+AMP)$ utilizando las cuantificaciones de la figura 34. **(B)** Cantidad total de nucleótidos de adenina como $ATP+ADP+AMP$, utilizando las cuantificaciones de la figura 34. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

2.5 La estirpe STXA2 presenta una alteración de los complejos tilacoidales y una disminución de las enzimas del CBB

Los cambios en los parámetros fotosintéticos observados en el mutante STXA2 posiblemente reflejan cambios en los niveles de las proteínas relacionadas con el proceso fotosintético. Por ello, se procedió a determinar mediante Wester blot los niveles de algunas proteínas tilacoidales que participan en el transporte de electrones y en el complejo ATPasa, y algunas enzimas del ciclo de CBB. También se analizó una proteína que participa en la síntesis de la clorofila (ChII) (Figura 36).

En la comparativa de la estirpe STXA2 en presencia de inductor con respecto al WT no se observan diferencias en los niveles de las proteínas analizadas con excepción de la proteína D1 del PSII y de las proteínas PsaB y PsaC del PSI, que presentan un $79.16 \pm 12.98\%$, $109.02 \pm 7.59\%$ y $116.58 \pm 10.90\%$ respectivamente (Figuras 36A y 36B). De esta forma, se observa un ligero aumento en la relación PSI/PSII en la estirpe STXA2.

La retirada del inductor produce una disminución generalizada de todas las proteínas anteriormente comentadas, aunque en diferentes niveles, excepto la FBPasa. En el caso del PSII, se observa una drástica caída de los niveles de D1 hasta alcanzar un $16.35 \pm 9.49\%$ con respecto al tiempo 0 horas (Figuras 36A y 36C). La otra proteína del PSII analizada también disminuye, aunque hasta alcanzar un nivel del $31.52 \pm 10.47\%$ a las 48 horas sin arsenito. Por otro lado, el contenido de PsaB y PsaD también disminuye al $34.84 \pm 6.68\%$ y $43.37 \pm 2.88\%$ respectivamente. Las proteínas analizadas de los otros dos grandes complejos del tilacoide, *Citb_{6f}* y ATPasa, también disminuyen (*PetA*, $42.88 \pm 14.60\%$ y *CF1*, $22.88 \pm 5.28\%$) (Figuras 36A y 36C). La PC, única proteína soluble que participa en el transporte de electrones, disminuye sus niveles, aunque en



RESULTADOS

menor medida respecto a las proteínas tilacoidales. Con respecto a las dos isoformas de la FNR, se observa una disminución en los niveles de la FNR_L (73.67±12.86%) y un fuerte incremento en los niveles de la FNR_S hasta alcanzar unos niveles del 264.33±89.32% después de 48 horas sin arsenito. Este resultado parece estar relacionado con los cambios en el flujo de electrones observados. Mientras que la FNR_L contiene un dominio de unión al PBS y reduce el NADP⁺ a partir de los electrones del LET, la FNR_S carece de este dominio de unión y oxida NADPH, mejorando posiblemente el CET a través de la Fd y del NDH-1 (Korn et al., 2009; Thomas et al., 2006).

El análisis de dos enzimas del ciclo de CBB, la Rubisco, a través de la subunidad grande (RbcL) y la enzima bifuncional con actividad sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (SBP/FBPasa), permiten observar una disminución hasta el 37.45±3.16% y 45.43±9.5% respectivamente tras retirar el arsenito del medio (Figuras 36A y 36C). A diferencia de esto, se observa un pequeño aumento en el nivel de la enzima FBPasa, que sólo presenta actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (110.37±11.07%) (Figuras 36A y 36C). Los estudios realizados con estas dos enzimas (Tamoj et al., 1999; Yan y Xu, 2008; Tesis Doctoral de Raquel María García Cañas), sugieren una función diferencial de ambas enzimas como comentaremos más adelante. La enzima SBP/FBPasa (*slr2094*), necesaria para la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato, es esencial para el crecimiento fotoautotrófico (Yan y Xu, 2008). Finalmente, la Chll, implicada en la síntesis de clorofila, disminuye al 67.25±10.11% respecto a los niveles iniciales.

Para analizar los cambios comentados anteriormente con mayor profundidad, se analizaron los complejos proteicos de las membranas fotosintéticas mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida Blue Native-PAGE. El uso de esta técnica ha permitido identificar y conocer la distribución de las proteínas que forman parte de estos complejos proteicos en diferentes organismos fotosintéticos. Como se observa en la Figura 37, en la estirpe WT se observan todos los complejos identificados previamente en *Synechocystis* (Bečková et al., 2017). El complejo más abundante corresponde con el PSI en forma de trímero, donde se encuentra la mayoría de la clorofila. Además, un alto porcentaje de los PSI y PSII se encuentran formando supercomplejos (SC) entre sí, aunque también existen formas monoméricas y diméricas del PSI y PSII. En el caso de la estirpe STXA2 en presencia de inductor se observa la ausencia de supercomplejos PSII-PSI, que son posibles moduladores en la transferencia de electrones fotosintético. Así, la disminución en los niveles de TrxA en un 90% parece afectar al acoplamiento entre los dos fotosistemas. Además, se observa un mayor contenido del PSI en forma de trímero, e incluso del PSII en forma monomérica y una ligera disminución en la forma dimérica del PSI.



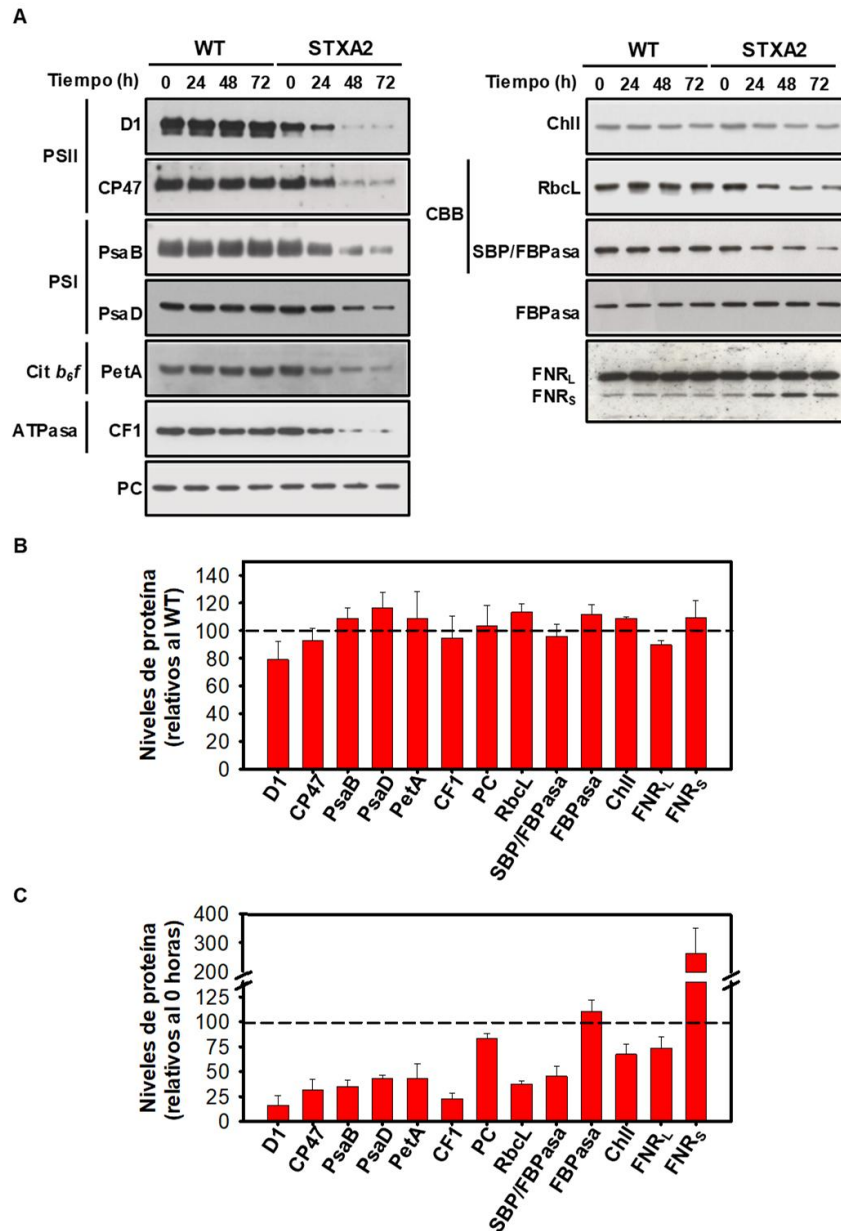


Figura 36. Análisis mediante Western blot de proteínas de la membrana tilacoidal y del ciclo de CBB en la estirpe STXA2. (A) Los extractos celulares totales correspondientes a 10^7 células de STXA2 y del WT se extrajeron y sometieron a una electroforesis en geles SDS-PAGE. El tiempo 0 horas corresponde a extractos celulares de las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito, mientras que el resto de tiempos indicados corresponden a extractos celulares tras la retirada del arsenito. (B y C) Cuantificación de los niveles de las proteínas indicadas en A mediante el programa ImageJ. La estirpe STXA2 en presencia de inductor (tiempo 0 horas) se comparó con la estirpe WT (tiempo 0 horas) en B, y la estirpe STXA2 después de 48 horas sin inductor se comparó con el tiempo 0 horas de la misma estirpe en C. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en B y C.



RESULTADOS

El análisis de los complejos proteicos después de 48 horas sin inductor se realizó con la misma cantidad de células y también con la misma cantidad de proteínas respecto al cultivo en presencia de inductor (Figura 37). Se observa una disminución drástica de los complejos proteicos a nivel global, a pesar de que la migración de los complejos no ha sido de forma consistente y homogénea, posiblemente por la acumulación de polímeros de reserva u otros compuestos entre las membranas tilacoidales.

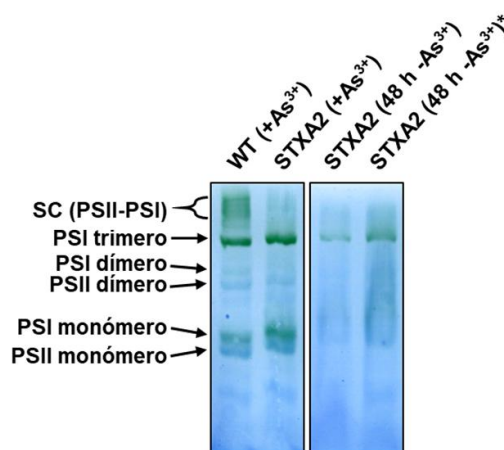


Figura 37. Análisis de los complejos tilacoidales mediante Blue-Native en las estirpes WT y STXA2. Las fracciones de membrana correspondiente a $2 \cdot 10^7$ células de las estirpes WT y STXA2 se extrajeron como se describe el apartado III.3.3.2. Las fracciones de membrana equivalente a $1.5 \cdot 10^7$ células de las estirpes WT y STXA2 con inductor, además de la estirpe STXA2 después de 48 horas sin inductor (3 primeros carriles), se sometieron a una electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida con gradiente (4%-10%). La tinción del gel se realizó después de sustituir el tampón del cátodo por un tampón con el colorante azul SERVA Blue G después de 1.5 horas de electroforesis (3 horas en total). *El mismo procedimiento se realizó con una fracción de membrana de la estirpe STXA2 después de 48 horas sin inductor (4º carril), utilizando la misma cantidad de proteínas de la misma estirpe con inductor (60 μ g).

2.6 Análisis del estado *redox* de las tiorredoxinas y de las enzimas SBP/FBPasa y FBPasa en la estirpe STXA2

Los sistemas de regulación *redox* son un importante control de la actividad metabólica en respuesta a la luz en los organismos fotosintéticos. La regulación *redox* en las cianobacterias ha sido estudiada solo en algunas proteínas, a diferencia de las plantas. Para analizar el estado *redox in vivo* de algunas proteínas en las cianobacterias, se han realizado diferentes aproximaciones utilizando agentes alquilantes que se unen a las cisteínas reducidas. Estos agentes añaden un determinado peso molecular que producen un cambio en la movilidad electroforética que se puede observar durante una electroforesis en geles SDS-PAGE.

Para analizar el estado *redox* de las TRX, se utilizó el agente alquilante ácido 4-acetamido-4'-maleimidilstilbeno-2,2'-disulfónico (AMS) que se une a las cisteínas reducidas y añade 0.5 kDa por cada una de ellas. Inicialmente, se realizaron ensayos



RESULTADOS

utilizando extractos celulares de la estirpe WT cultivada en condiciones estándar y obtenidos por rotura con vórtex y perlas de vidrio. Los extractos celulares se trataron con un agente reductor (DTT), con agentes oxidantes (H_2O_2 y Cu^{2+}) o no se trataron con ningún agente. Posteriormente, las muestras se dividieron y la mitad de ellas se trataron con AMS (ver detalles en el apartado III.3.6). Finalmente, las muestras se sometieron a una separación electroforética mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y a un Western blot utilizando el anticuerpo anti-TrxA. Los resultados obtenidos de esta aproximación se muestran en la Figura 38A, donde se observa una banda con menor movilidad electroforética de TrxA en presencia de DTT+AMS, en esta situación las dos cisteínas que presenta TrxA están reducidas y por tanto se unen al AMS. Por otro lado, la muestra tratada con Cu^{2+} solo permite observar una banda con la misma movilidad electroforética respecto a la muestra sin AMS y que corresponde a la proteína completamente oxidada. Curiosamente, en el carril de la muestra tratada con H_2O_2 se observan tres bandas, una banda corresponde a la forma reducida, otra banda corresponde a la forma oxidada tras formarse un puente disulfuro intramolecular (Figura 38A, Ox1), y una tercera banda corresponde a un dímero de TrxA (Figura 38A, Ox2).

Debido a estos resultados y para evitar la posible oxidación durante el proceso de rotura con perlas de vidrio y en agitación con vórtex, se realizaron ensayos utilizando ácido tricloroacético (TCA) directamente sobre las células para bloquear el estado *redox in vivo* de aquellas proteínas con cisteínas sensibles a oxidación.

Este protocolo (ver detalles en el apartado III.3.6) se utilizó para evaluar el estado *redox in vivo* de TrxA en oscuridad y en luz. Para ello, las células del WT se incubaron en oscuridad durante 2 horas y posteriormente se iluminaron 15 minutos con diferentes intensidades de luz (50 (LL), 200 (ML) y 500 (HL) $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Como se observa en la Figura 38A, la TrxA después de 2 horas en oscuridad (O) está en forma oxidada (Figura 38B), un pequeño porcentaje de TrxA que se encuentra en forma de dímero (Figura 38B, Ox2). Cuando los cultivos se someten a 15 minutos de luz se observa una fracción de TrxA en forma reducida y no se observan dímeros. En nuestras condiciones estándar de crecimiento y luz normal (LN), el porcentaje de TrxA en forma reducida es un $32.62\pm 3.55\%$ con respecto al total (Figuras 38B y 38E). Además, no se observan grandes diferencias entre las diferentes intensidades lumínicas.



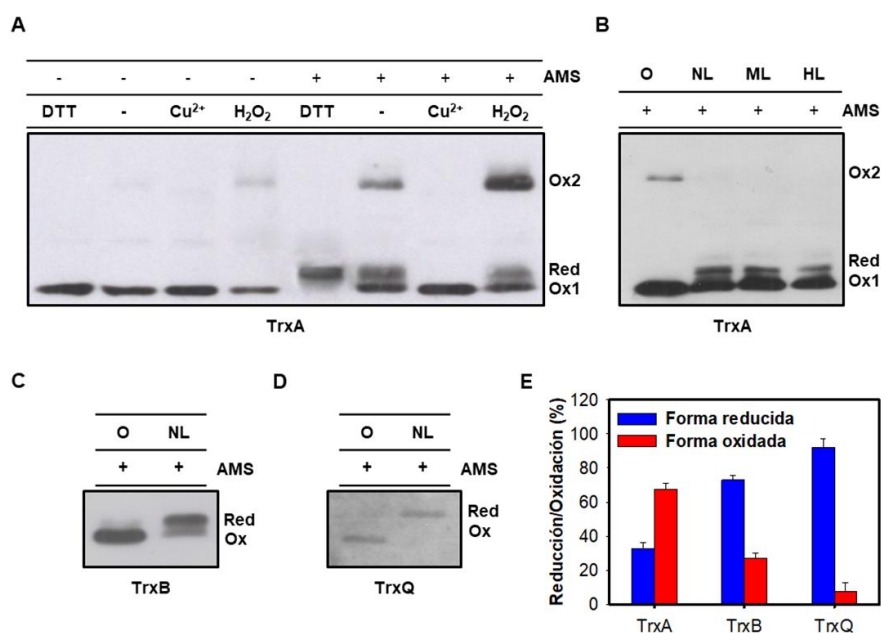


Figura 38. Estado *redox in vivo* de las tiorredoxinas TrxA, TrxB y TrxQ en *Synechocystis*. (A) Análisis mediante Western blot del estado *redox* de TrxA en extractos celulares tratados con DTT (100 mM), CuCl₂ y H₂O₂. Posteriormente, las proteínas se resuspendieron en un tampón con AMS (10 mM) y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se utilizó el anticuerpo anti-TrxA. (B) Análisis mediante Western blot del estado *redox in vivo* de TrxA en diferentes intensidades lumínicas. Las células de la estirpe WT en oscuridad (2 horas) o tras 15 minutos de iluminación con 50, 200 y 500 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se les añadió TCA (10%). Posteriormente, las proteínas se resuspendieron en un tampón con AMS (10 mM) y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se utilizó el anticuerpo anti-TrxA. (C) Análisis mediante Western blot del estado *redox in vivo* de TrxB en cultivos a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siguiendo el mismo procedimiento que en B y utilizando el anticuerpo anti-TrxB. (D) Análisis mediante Western blot del estado *redox in vivo* de TrxQ en cultivos a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siguiendo el mismo procedimiento que en B y utilizando el anticuerpo anti-TrxQ. (E) Cuantificación del nivel reducido y oxidado de TrxA, TrxB y TrxQ en condiciones de crecimiento estándar obtenidos a partir de B, C y D con el programa ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

También se realizó el análisis del estado *redox in vivo* de TrxB y TrxQ en la estirpe WT en condiciones de oscuridad y luz normal (Figuras 38C y 38D). En el caso de TrxB y TrxQ se observa que en presencia de luz están un $75.19\pm 6.22\%$ y $96.49\pm 3.82\%$ en forma reducida, respectivamente (Figura 38E). Además, solo se observa mayoritariamente la forma oxidada en oscuridad (2 horas) (Figuras 38C y 38D) y no se observan dímeros en ningún caso.

De esta forma, el análisis *in vivo* indica que la reducción de TrxA, TrxB y TrxQ ocurre de manera dependiente de luz en *Synechocystis*, como se ha observado recientemente en *Anabaena* (Mihara et al., 2019).

Una vez establecido esto, se llevó a cabo el análisis *in vivo* del estado *redox* de TrxA en la estirpe STXA2 siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente,



RESULTADOS

donde se observa que está principalmente en su forma reducida a diferencia de lo observado en la estirpe WT (Figura 39). La disminución en los niveles de TrxA después de retirar el inductor no permiten analizar su estado *redox*.

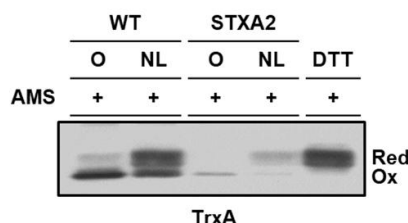


Figura 39. Estado *redox in vivo* de TrxA en la estirpe STXA2 con arsenito. Análisis mediante Western blot del estado *redox in vivo* de TrxA en la estirpe STXA2 en presencia de inductor. A la misma cantidad de células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar se les añadió TCA (10%) y se incubaron durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las proteínas se resuspendieron en un tampón con AMS (10 mM) y se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE en condiciones no reductoras y posterior Western blot utilizando el anticuerpo anti-TrxA.

Por otro lado, se analizó el estado *redox* de TrxB en la estirpe STXA2 debido a que los bajos niveles de TrxA, TRX más abundante en *Synechocystis*, pueden producir cambios en luz continua o en las transiciones oscuridad-luz en las otras TRX. El análisis del estado *redox* de TrxB en la estirpe STXA2 con inductor y después de 48 horas sin inductor, no permite observar diferencias en ninguna situación con respecto al WT (Figura 40A), presentándose en forma reducida fundamentalmente. Para analizar las transiciones luz-oscuridad, las estirpes WT y STXA2 se incubaron 10 minutos en oscuridad y 10 minutos en luz y se analizó el estado *redox* de TrxB mediante Western blot. Se observa que existen algunos cambios en el estado *redox* con respecto a la estirpe WT (Figuras 40B y 40C). En presencia de inductor, TrxB se encuentra totalmente oxidada en la estirpe WT mientras que se encuentra parcialmente reducida en la estirpe STXA2 en oscuridad (Figura 40B). En luz, la estirpe STXA2 presenta un mayor porcentaje de la forma reducida de TrxB respecto a la estirpe WT (Figura 40B). Este resultado pone de manifiesto la flexibilidad de las TRX dependiente de luz cuando se produce una disminución de la TRX más abundante. La retirada del inductor produce un efecto similar, aunque con algunas diferencias con respecto a los niveles reducidos de TrxB en luz (Figura 40C).



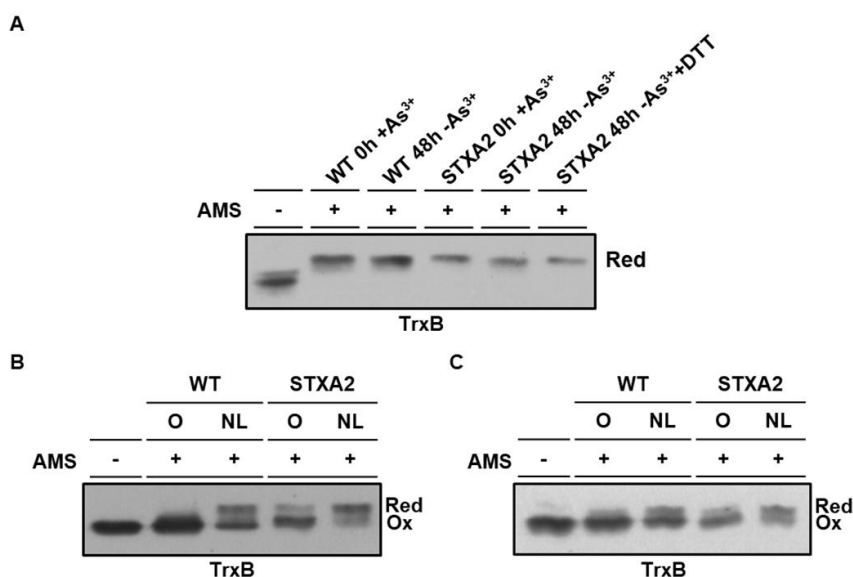


Figura 40. Estado redox in vivo de TrxB y cambios en la respuesta a luz en la estirpe STXA2. (A) Análisis mediante Western blot del estado redox in vivo de TrxB en la estirpe STXA2 en presencia de inductor. A la misma cantidad de células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar se les añadió TCA (10%). Posteriormente, las proteínas se resuspendieron en un tampón con AMS (10 mM), se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y posterior Western blot utilizando el anticuerpo anti-TrxB. Como control se utilizó una muestra sin AMS (-). **(B)** Respuesta a la presencia de luz ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) de las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor y **(C)** tras 48 horas sin inductor siguiendo el mismo procedimiento descrito en A.

Los resultados obtenidos en la estirpe STXA2 con respecto al transporte de electrones fotosintéticos, y la generación y consumo de NADPH parecen indicar un retraso y limitación en el ciclo de CBB, además de otros procesos celulares. Debido a esto, se analizó el estado redox de una de las enzimas del ciclo de CBB, la enzima bifuncional SBP/FBPasa. Esta enzima es esencial para el crecimiento fotoautotrófico en *Synechocystis* (Yan y Xu, 2008), la resolución de su estructura y estudios de mutagénesis dirigida, además del análisis de las cisteínas susceptibles de modificación redox en los ciclos luz-oscuridad han puesto de manifiesto una posible regulación redox a través de alguna de las 9 cisteínas que presenta (Feng et al., 2014; Guo et al., 2014). En nuestro grupo, los ensayos in vitro de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa con esta enzima y utilizando las diferentes TRX han permitido observar una posible regulación redox mediada por TrxA y TrxB (Tesis Doctoral de Raquel María García Cañas). Por todo ello, se realizó un estudio del estado redox de la SBP/FBPasa en las estirpes WT y STXA2. El protocolo utilizado para visualizar el estado redox de la TRX no se pudo utilizar en este caso por lo que se utilizó un protocolo con dos agentes alquilantes, N-etilmaleimida (NEM) y Metil-PEG-Maleimida o MM(PEG₂₄), que bloquean las cisteínas



reducidas al unirse a los grupos tioles. Las células se trataron con NEM que produce un cambio en la movilidad electroforética insignificante debido a que incorpora 0.125 kDa por cada cisteína reducida. Posteriormente, los extractos celulares se trataron con DTT para reducir los puentes disulfuros y finalmente con MM(PEG₂₄). Este segundo agente alquilante incorpora 1.24 kDa por grupo tiol reducido y reduce la movilidad electroforética. En la Figura 41A se muestra un esquema del protocolo (ver detalles en el apartado III.3.6).

Con respecto a la enzima SBP/FBPasa, en las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor se observa principalmente una banda correspondiente a la forma reducida. Además, se observan dos bandas con menor movilidad electroforética y que corresponden a formas oxidadas debido a que han unido MM(PEG₂₄). La cuantificación de las formas reducida y oxidada (Ox1, Ox2 y Ox3 en conjunto), permiten observar diferencias significativas. Mientras que la estirpe WT presenta un 74.39±3.34% de la SBP/FBPasa en forma reducida, la estirpe STXA2 tiene un 60.67±5.73%. Después de 48 horas sin inductor, se observa un aumento en las formas oxidadas con respecto a la forma reducida, siendo esta última del 27.23±3.63%. Curiosamente, el principal estado redox corresponde con la forma oxidada Ox2.

También se analizó el estado *redox* de otra enzima que ha sido estudiada *in vitro* en nuestro grupo de investigación, la enzima FBPasa. Esta enzima presenta 3 cisteínas y una regulación *redox* en la que la forma reducida, en presencia de DTT o TrxA, no presenta actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa, sugiriendo que en condiciones reductoras en luz está inactiva (Trabajo Fin de Grado de Clara Gómez Romero). Debido a la presencia de una banda inespecífica que está presente entre las formas reducida y oxidada, se utilizó un mutante de esta enzima (Δ FBPasa). El análisis *in vivo* del estado *redox* sólo permite observar pequeñas diferencias entre las estirpes WT y STXA2. En presencia de inductor, la estirpe WT tiene un 66.01±4.06% de la FBPasa en forma reducida, mientras que la estirpe STXA2 tiene un 62.42±3.22%. La retirada del inductor sólo permite observar un aumento en un 10% de la forma oxidada y activa con respecto al tiempo 0 horas (53.97±4.07%).

Para medir la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa *in situ* se desarrolló un protocolo específico a partir de otros diseñados en organismos fotosintéticos superiores (ver detalles en el apartado III.6.1). Como hemos comentado, *Synechocystis* presenta las enzimas FBPasa y SBP/FBPasa que tienen actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa, aunque la SBP/FBPasa es más abundante en el interior celular y posiblemente represente hasta el 90% de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (Tesis Doctoral de Raquel García Cañas). Además, los ensayos *in vitro* indican que la SBP/FBPasa se encuentra activa en forma reducida, en presencia de DTT o una TRX, mientras que la FBPasa se



encuentra inactiva cuando está en forma reducida como hemos comentado anteriormente. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de DTT.

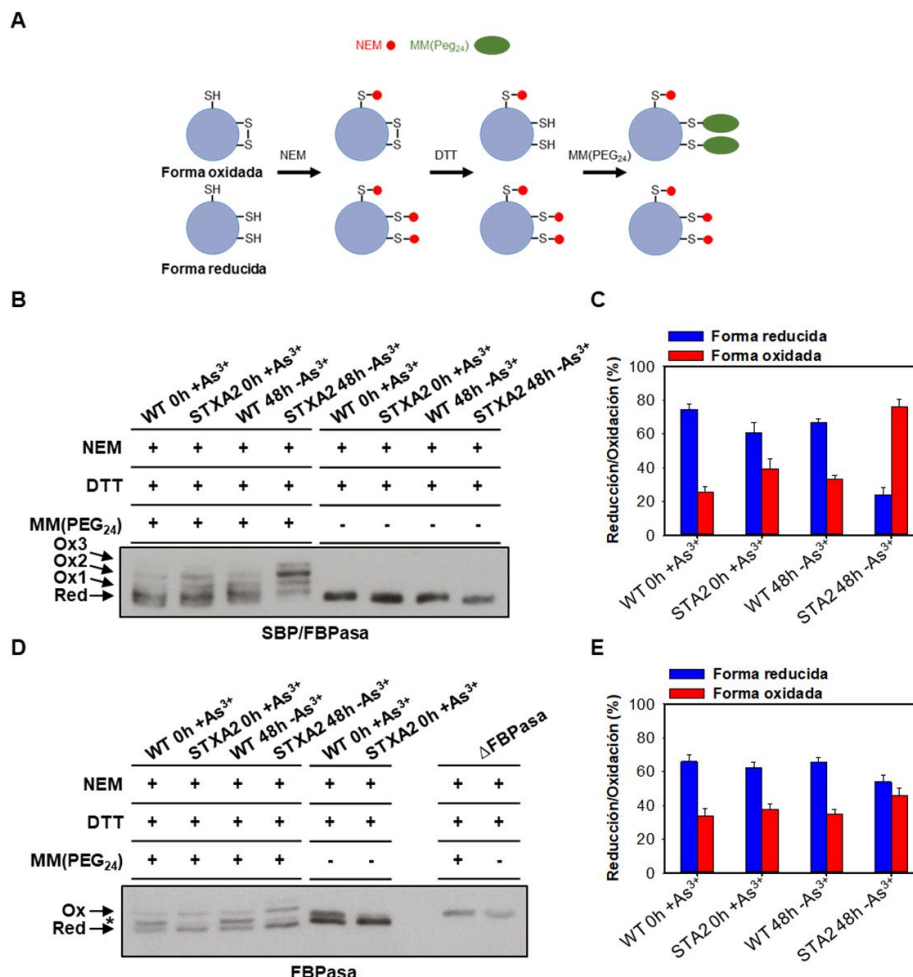


Figura 41. Estado redox in vivo de la SBP/FPasa y FBPasa en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Representación esquemática del procedimiento para determinar el estado redox in vivo de las proteínas analizadas. (B) Análisis mediante Western blot del estado redox de la SBP/FPasa. A las células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito o tras 48 horas sin el mismo, se les añadió NEM (10 mM). Posteriormente, las proteínas se extrajeron en presencia de NEM, se sometieron a TCA (10%) para eliminar el NEM y se trataron con DTT (100 mM) para reducir los puentes disulfuro. Finalmente, las proteínas se trataron con un tampón en presencia o ausencia de MM(PEG₂₄) y 20 µg de proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y posterior Western blot utilizando el anticuerpo anti-SBP/FPasa. (C) Cuantificación del nivel reducido y oxidado de la proteína SBP/FPasa obtenidos a partir de B con el programa ImageJ. (D) Análisis mediante Western blot del estado redox de la FBPasa. El Procedimiento seguido es el mismo que en B. El anticuerpo utilizado es anti-FBPasa. La estirpe ΔFBPasa se utilizó como control y el asterisco (*) indica una banda inespecífica. (E) Cuantificación del nivel reducido y oxidado de la proteína FBPasa obtenidos a partir de D con el programa ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en C y E.



RESULTADOS

Cuanto se utilizan células de la estirpe STXA2 en presencia de inductor y con DTT, no se observan diferencias en la actividad FBPasa con respecto al WT (Figura 42A). La retirada del inductor del medio produce una disminución de la actividad en presencia de DTT que estaría relacionado principalmente con la disminución en los niveles de la enzima SBP/FPasa (Figura 42A). En el ensayo en ausencia de DTT se observan pequeñas diferencias entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito que están relacionadas con los pequeños cambios en los niveles de las proteínas y con el estado *redox* de ambas enzimas (Figura 42B). La retirada de arsenito produce un pequeño aumento en la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa con respecto a la presencia de arsenito que podría estar relacionado con las diferencias en la cantidad de FBPasa y con el aumento de la forma oxidada y activa. En todos los casos, hay que tener en cuenta que la agitación de unos 5 segundos realizados para la permeabilización de las células con MTA (ver detalles en el apartado III.6.1), puede producir la inactivación parcial de la enzima SBP/FPasa debido a su oxidación, como se ha observado en nuestro grupo *in vitro* (Tesis Doctoral de Raquel García Cañas), dificultando el análisis de la actividad.

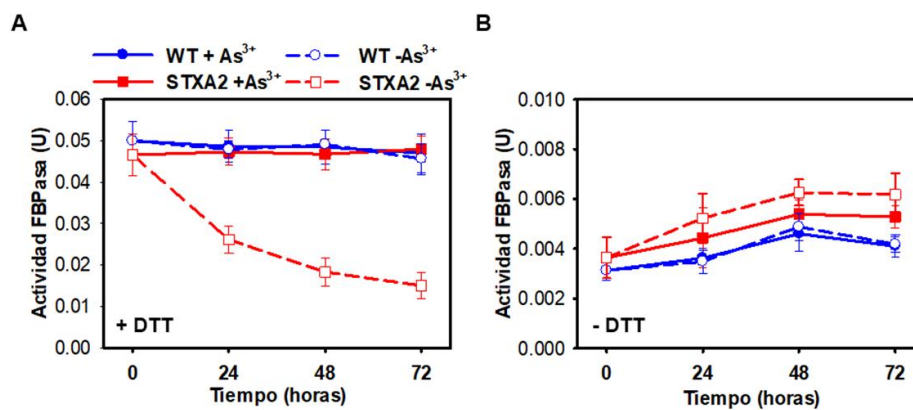


Figura 42. Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa *in situ* en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. $2 \cdot 10^8$ células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento en presencia y ausencia de arsenito se utilizaron para medir la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa en células permeabilizadas con MTA (A) en presencia y (B) en ausencia de DTT. Los datos se normalizaron a 10^7 células. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.



3. Respuesta del mutante STXA2 a estrés lumínico y oxidativo

3.1 Respuesta a estrés oxidativo y niveles de ROS en el mutante STXA2

La fotosíntesis oxigénica en cianobacterias y cloroplastos da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo necesario la presencia de sistemas de detoxificación entre los que se encuentran las PRX. Estas enzimas catalizan la reducción dependiente de grupos tioles de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito o hidroperóxidos (Wood et al., 2003). Diversos estudios han demostrado la capacidad de las tioredoxinas para reducir las PRX presentes en cianobacterias. Por otro lado existe controversia sobre si el glutatión o las glutarredoxinas son agentes reductores de estas PRX (Hosoya-Matsuda et al., 2004; Pérez-Pérez et al., 2009b). Todas las tioredoxinas tienen la capacidad de reducir PRX, aunque la abundancia de TrxA en *Synechocystis* podría indicar una participación más destacada de esta como donador, aun teniendo menos eficiencia catalítica que TrxQ o TrxB en ciertas PRX (Pérez-Pérez et al., 2009b).

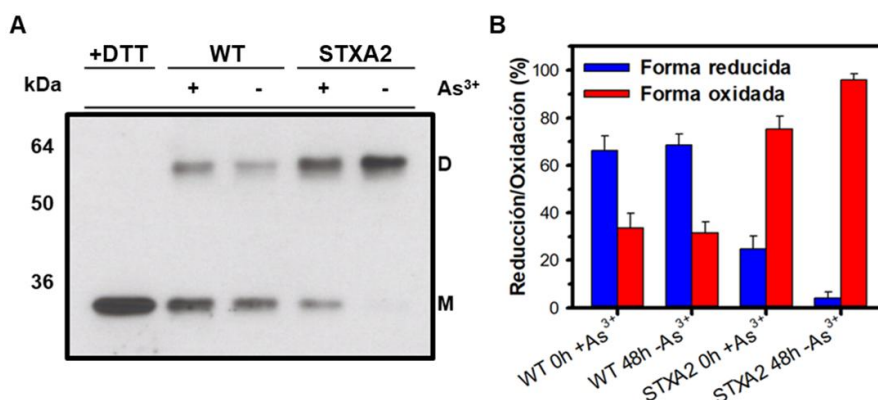


Figura 43. Estado *redox in vivo* de la 2-Cys Prx en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Análisis mediante Western blot del estado *redox* de 2-Cys Prx en células de WT y STXA2. La misma cantidad de células de WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (0 horas) y después de 48 horas sin arsenito, se cargaron en geles SDS-PAGE en condiciones no reductoras al 15%. Como control se utilizaron muestras de la estirpe WT que se resuspendieron en tampón de Laemmli 1X con 100 mM de DTT. La proteína 2-Cys Prx migra como monómero (M) cuando esta reducida y dímero (D) cuando se encuentra oxidada. (B) Cuantificación del nivel reducido y oxidado de la proteína 2-Cys Prx obtenidos a partir de A con el programa ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por todo ello, se analizó el estado *redox* de la proteína 2-Cys Prx en el mutante STXA2 mediante Western blot, los resultados se muestran en la Figura 43. En la estirpe WT la proteína 2-Cys Prx se encuentra *in vivo* en forma monomérica (reducida) y en forma dimérica (oxidada) (Figura 43A). Concretamente, se encuentra en su forma oxidada un 35% aproximadamente en ausencia y en presencia de arsenito (Figuras 43A y 43B). Por otro lado, en la estirpe STXA2 en presencia de inductor se observa un 70%



RESULTADOS

de la 2-Cys Prx en forma oxidada. Cuando eliminamos el inductor y después de 48 horas tenemos una disminución drástica de los niveles de TrxA, se produce un aumento de la forma oxidada hasta el 96% (Figuras 43A y 43B). Estos resultados parecen indicar claramente una relación entre los niveles de TrxA y el mantenimiento del estado *redox* de la proteína 2-Cys Prx, corroborando los datos obtenidos *in vitro* (Pérez-Pérez et al., 2009b; Stork et al., 2005).

Teniendo en cuenta que TrxA parece donar los electrones a una de las peroxirredoxinas más abundantes en las cianobacterias y que posiblemente regule otras peroxirredoxinas, se decidió analizar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la estirpe STXA2. Para ello, las estirpes WT y STXA2 en ausencia o presencia de inductor se trataron con una sonda fluorescente CM-H₂DCFDA que reacciona con las ROS presentes en las células (ver detalles en el apartado III.4.6). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 44.

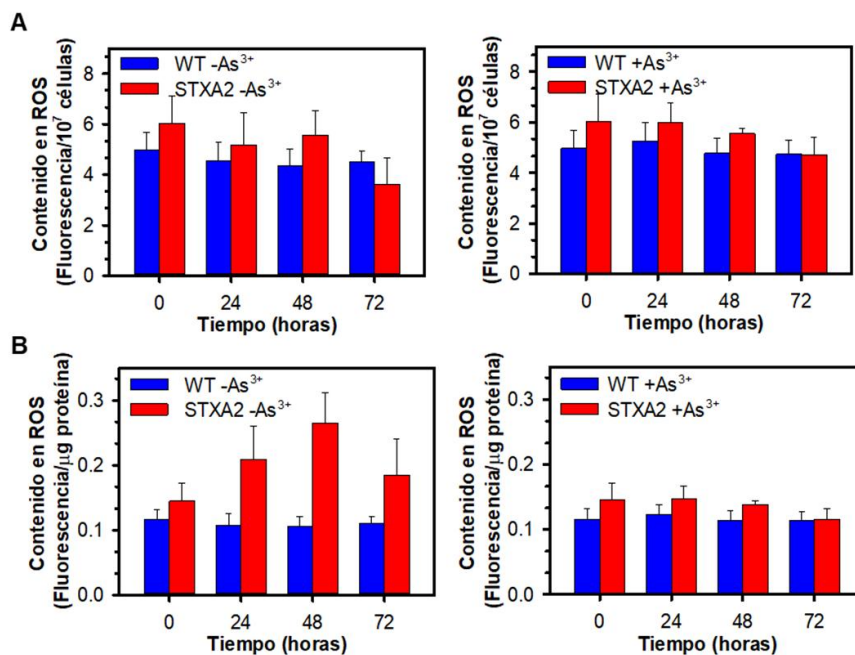


Figura 44. Contenido en ROS de las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. Determinación de ROS en células WT y STXA2. El procedimiento de cuantificación se realizó con células WT y STXA2 cultivadas en ausencia y en presencia de 1 mM arsenito. Los resultados se expresan en función (A) del número de células (10⁷ células) y (B) por proteína (1 μg de proteínas totales). El tiempo 0 horas corresponde a las estirpes en presencia de arsenito en todos los casos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

La estirpe STXA2 en presencia de inductor presenta un 20% aproximadamente más de contenido en ROS que la estirpe WT en fase exponencial (Figura 44A, tiempo 0 horas). Esta diferencia disminuye a lo largo del tiempo posiblemente debido a la menor



RESULTADOS

intensidad de luz recibida por célula. La disminución en los niveles de TrxA por debajo del 10% no produce un aumento a nivel celular de las ROS, y no se observan diferencias significativas con respecto al WT (Figura 44A).

A pesar de los resultados obtenidos hay que tener en cuenta que la generación de las ROS está directamente relacionada con la cadena de transporte de electrones fotosintéticos y con la excitación de los pigmentos en ambiente oxigénico (ver detalles en el apartado I.4.1). Como hemos comentado anteriormente, la disminución progresiva de los niveles de TrxA después de la retirada del inductor, produce una disminución en los componentes del aparato fotosintético, por lo tanto, se espera una pérdida de la cantidad de proteína total en esta estirpe. Si la concentración de las ROS se expresa en función de la cantidad de proteína total obtenemos con un aumento de las ROS tras 24 y 48 horas sin inductor (Figura 44B).

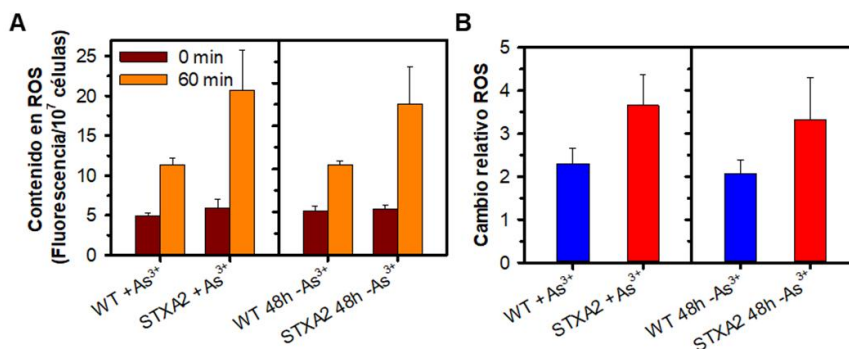


Figura 45. Contenido en ROS tras la inducción con metil viológeno en las estirpes WT y STXA2 con distintos niveles de TrxA. (A) Niveles de ROS en células WT y STXA2 antes y después de 60 minutos de exposición con 5µM de MV. Se utilizaron células WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (0 horas) y tras 48 horas sin arsenito. **(B)** Cambios relativos en WT y STXA2 obtenidos con los resultados de A. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

Por otro lado, se analizó la respuesta de la estirpe STXA2 a la presencia de un agente oxidante como el metil viológeno (MV). El MV actúa aceptando electrones del PSI y convirtiendo el O₂ en O₂^{•-}, con la posterior producción de H₂O₂ y •OH. En presencia de este agente se produce una limitación en la formación de NADPH y la consiguiente limitación en la capacidad de fijación de CO₂. La estirpe STXA2 en presencia de inductor muestra una menor capacidad de respuesta a estrés por MV (Figura 45A), aumentando 3.6 veces los niveles de generación de las ROS frente a 2.3 veces que aumenta en la estirpe WT (Figura 45B). La disminución de los niveles de TrxA después de la retirada del inductor no produce un aumento en los niveles de ROS en la estirpe STXA2, obteniéndose unos resultados similares a la estirpe STXA2 con niveles mayores de TrxA (Figuras 45A y 45B). Esto puede ser debido posiblemente a varios factores, como el



RESULTADOS

deterioro de los componentes de la maquinaria fotosintética, la presencia de componentes no fotoquímicos fotoprotectores o incluso la presencia de enzimas detoxificantes no dependientes de TrxA.

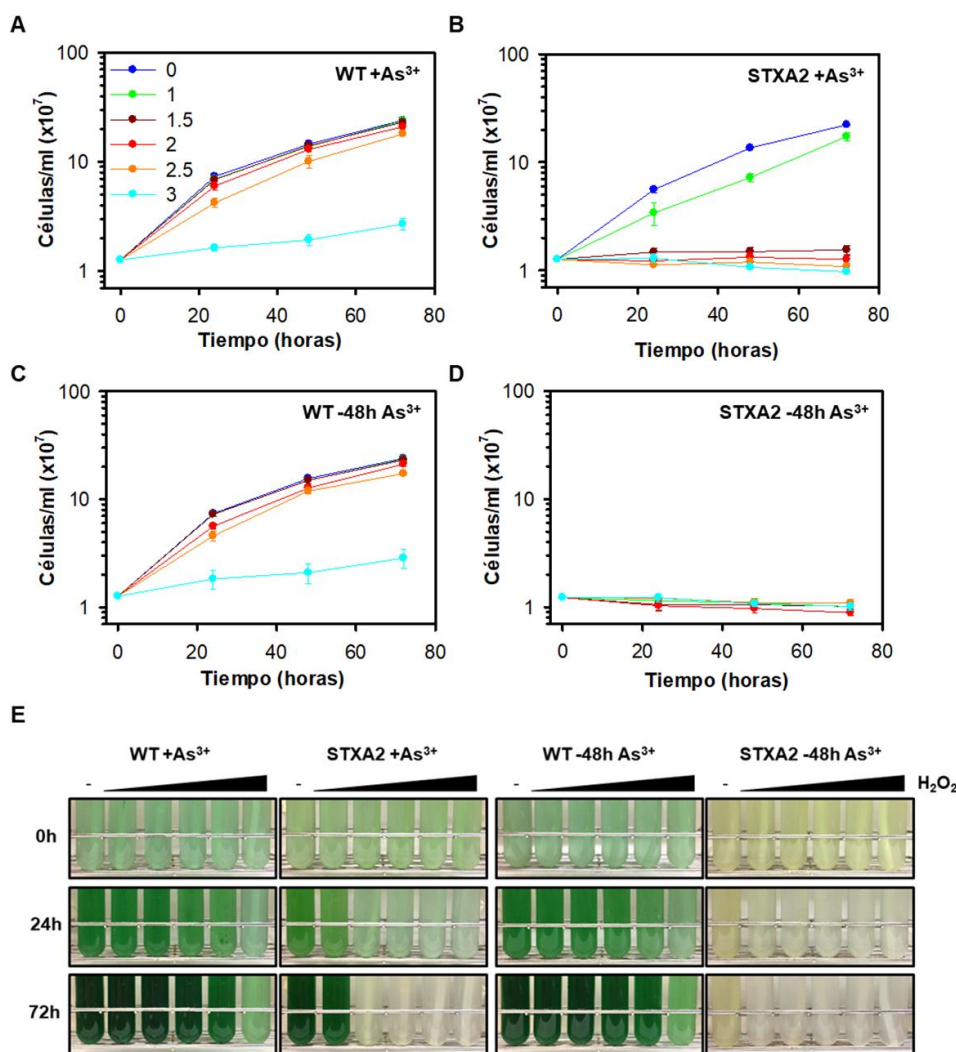


Figura 46. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en diferentes concentraciones de H₂O₂. Los cultivos en condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (A y B) y después de 48 horas sin arsenito (C y D), se ajustaron a la misma concentración celular 1.5 · 10⁷ células · ml⁻¹ y se sometieron a 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mM de H₂O₂. (E) Fotografía de los cultivos referidos en A, B, C y D. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en A, B, C y D.

Además de la medida de las ROS, se evaluó la respuesta a estrés oxidativo de la estirpe STXA2 con diferentes niveles de TrxA, mediante el análisis del crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂. Para ello, las células de las estirpes WT y STXA2 en presencia y en ausencia (48 horas) de arsenito se cultivaron con distintas concentraciones de H₂O₂ en el medio (Figura 46). En presencia de arsenito, la



estirpe STXA2 presenta una mayor sensibilidad a H_2O_2 con respecto a la estirpe WT (Figuras 46A, 46B y 46E). Cuando se adicionan al medio concentraciones superiores a 1 mM de H_2O_2 , estas provocan la muerte celular de la estirpe STXA2 mientras que la estirpe WT solo presenta un retraso en el crecimiento directamente relacionado con la concentración de H_2O_2 presente. La retirada del inductor y, por lo tanto, la disminución en los niveles de TrxA de STXA2, conlleva un aumento en la sensibilidad a H_2O_2 , produciéndose la muerte celular en todas las concentraciones de H_2O_2 ensayadas (Figuras 46D y 46E).

3.2 Sensibilidad a altas intensidades lumínicas del mutante STXA2

Las TRX son cruciales para la adaptación a cambios en las condiciones ambientales, siendo excelentes sensores redox. En cianobacterias, algunas de estas TRX como la TrxB y TrxQ, se han relacionado con la respuesta a alta intensidad lumínica y en la defensa a estrés oxidativo (Pérez-Pérez et al., 2009a). La estirpe STXA2 nos permitirá determinar si TrxA puede tener un papel en la aclimatación a alta intensidad lumínica.

Se analizó el crecimiento del mutante STXA2 en distintas intensidades lumínicas durante 96 horas, en ausencia y en presencia del inductor. Las estirpes WT y STXA2 cultivadas en condiciones estándar de crecimiento y en presencia de 1 mM arsenito, se lavaron e inocularon en medio nuevo en ausencia y presencia del inductor y en intensidades lumínicas de 50, 200, 500 y 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Como se observa en la Figura 47, la tasa de crecimiento de la estirpe WT aumenta hasta 500 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante las primeras 24 horas, mientras que el crecimiento en intensidades lumínicas superiores (1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no conlleva a tasas de crecimiento superiores (Figuras 47A-47D). Por otro lado, el crecimiento del mutante STXA2 en presencia de arsenito no está comprometido en ninguna de las intensidades lumínicas, aunque presenta un retraso con respecto al WT principalmente a 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figuras 47A-47D). Las tasas de crecimiento de STXA2 en presencia de inductor aumentan hasta 500 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, aunque se ve fuerte disminuida a 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figuras 47A-47D). La caída en los niveles de TrxA al eliminar el inductor afecta a la viabilidad celular en 500 y 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figuras 47C-47E).



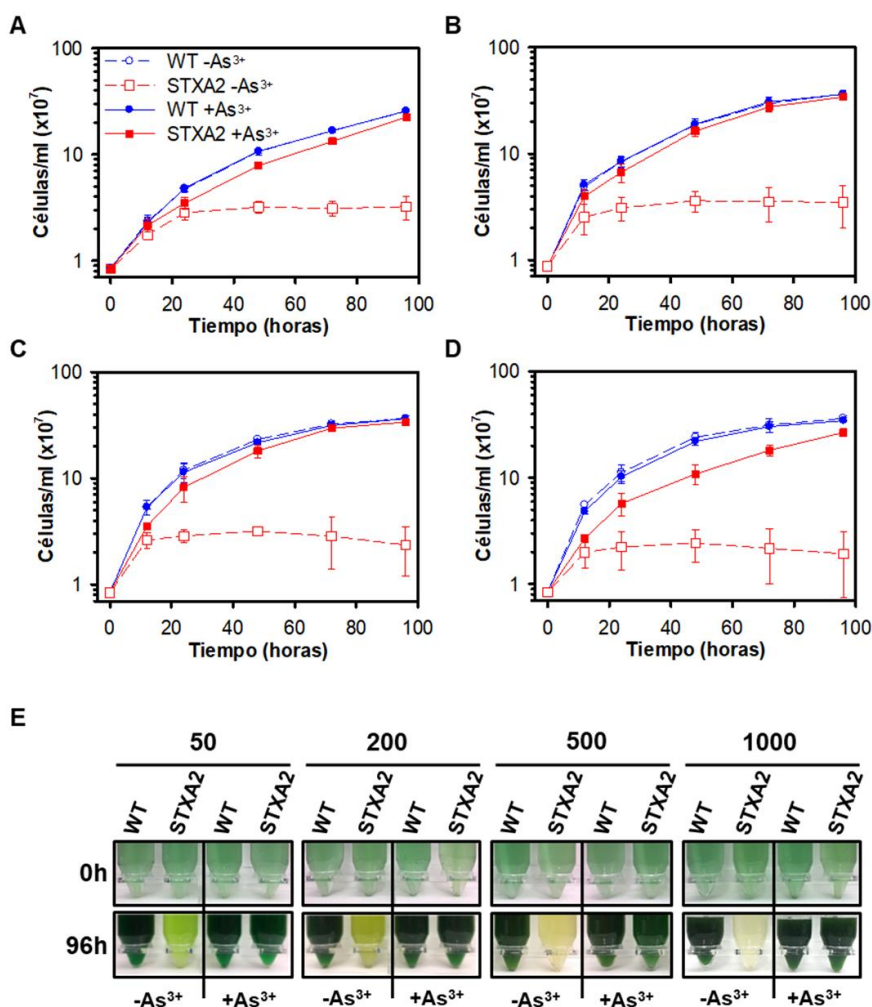


Figura 47. Crecimiento de las estirpes WT y STXA2 en diferentes intensidades lumínicas. Las estirpes WT y STXA2 se cultivaron en condiciones estándar de crecimiento en ausencia y en presencia de arsenito, y en 50 (A), 200 (B), 500 (C) y 1000 (D) $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (E) Fotografía de los cultivos referidos en A, B, C y D. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en A, B, C y D.

En las condiciones descritas, se observa un aumento en la concentración de clorofila ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en la estirpe STXA2 tras 24 horas en las condiciones estándar de crecimiento (50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 48). Cuando esta estirpe se cultiva en intensidades lumínicas superiores, se aprecia una disminución en la cantidad de clorofila, que lleva a la muerte celular cuando se cultiva en intensidades de 500 y 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 48).



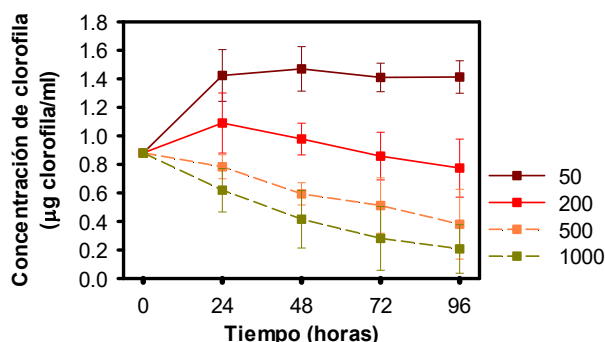


Figura 48. Evolución en la concentración de clorofila de la estirpe STXA2 en las diferentes intensidades lumínicas. Cantidad de clorofila presente en las células de la estirpe STXA2 cuando se cultiva en ausencia de arsenito y en 50, 200, 500 y 1000 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las condiciones de crecimiento se detallan en el texto. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

3.3 La estirpe STXA2 presenta cambios en los mecanismos de fotoprotección

La presencia de niveles reducidos de TrxA produce una serie de cambios en la cadena de transporte de electrones que conllevan modificaciones en algunos mecanismos relacionados con la fotoprotección como son el estado de transición, el CET o la vía de las oxidasas terminales y flavoproteínas.

Como se ha indicado en el apartado 1.2.4.1, dos de los principales mecanismos de NPQ descritos en las cianobacterias son el estado de transición y la proteína OCP, siendo esta última más relevante en condiciones de alta intensidad lumínica (Kirilovsky, 2015; Takahashi et al., 2018). Para analizar la respuesta de las estirpes a cambios en la intensidad lumínica se llevaron a cabo cinéticas de inducción-recuperación utilizando la estirpe WT y el mutante STXA2 en ausencia y presencia de inductor mediante Dual PAM-100. Estas cinéticas se realizaron para analizar la capacidad de adaptarse a un cambio en la intensidad lumínica, por lo que aplicamos una intensidad de 200 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, cuatro veces la luz de crecimiento, tras la adaptación previa a oscuridad. Los resultados se muestran en la Figura 49.

En la estirpe WT, la iluminación produce un rápido aumento de la fluorescencia basal (F_s), que posteriormente disminuye hasta alcanzar un estado estable. Cuando se analiza la fluorescencia en STXA2 en presencia de inductor se observa que esta presenta un aumento inicial de menor amplitud que en el WT, aunque el parámetro F_s aumenta posteriormente de manera progresiva hasta alcanzar un estado estable después de 200 segundos (Figuras 48A y 48B). Este aumento progresivo, que ocurre de la misma forma que en la luz de crecimiento (Figura 21), se debe al estado de transición. En estas condiciones, los valores correspondientes a F_q y $Y(II)$ presentan solo pequeñas diferencias con respecto al WT. Cuando se apaga la luz se observa un



RESULTADOS

retorno instantáneo al estado en oscuridad en la estirpe WT (F_0 y F_{md}), ocurriendo de manera progresiva y muy lenta en el caso de la estirpe STXA2, y observándose además un pronunciado aumento post-iluminatorio (Figura 49B). Cuando se analiza este comportamiento en la estirpe STXA2 pasadas 48 horas de la eliminación del inductor, se observa un fuerte aumento inicial en el F_s posiblemente debido a las fuertes limitaciones en el lado aceptor del PSI (Figura 49D). Además, esta nueva situación produce unos niveles de F_q y $Y(II)$ menores con respecto a las estirpes WT y STXA2 con arsenito. Los niveles de fluorescencia regresan al estado en oscuridad después de finalizar la luz actínica, observándose en este mutante también un aumento post-iluminatorio inicial.

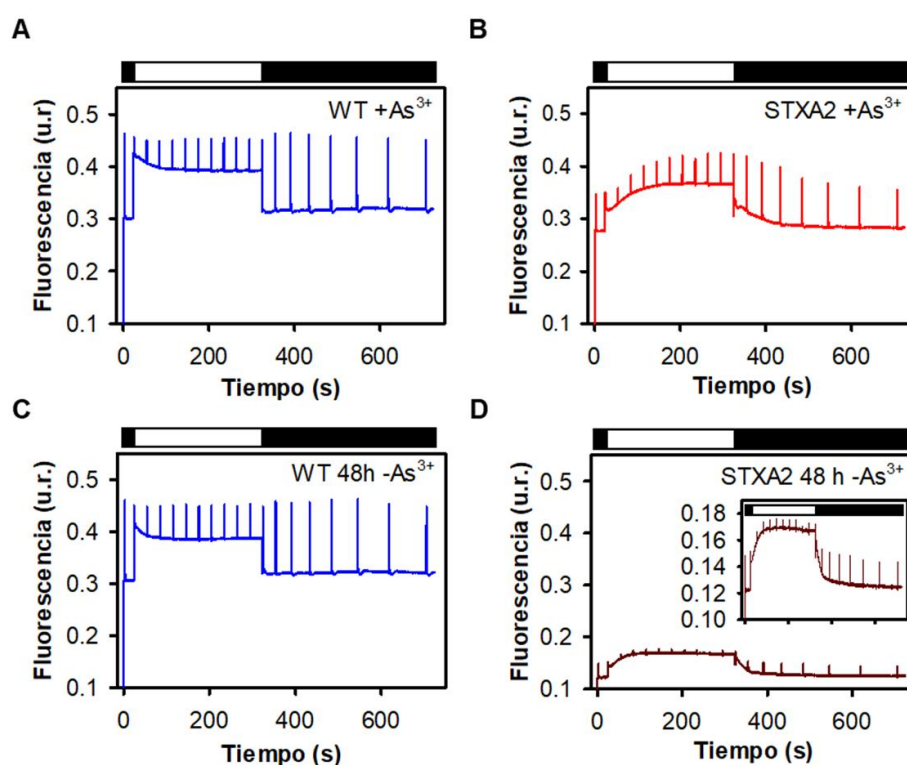


Figura 49. Curvas de inducción-recuperación en condiciones de alta intensidad lumínica. Células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en presencia de arsenito (0 horas) (A y B) y tras 48 horas sin arsenito (C y D), se ajustaron con la misma concentración de células ($2 \cdot 10^7$ células \cdot m), para una inducción de la fluorescencia de la misma manera que se detalla en la figura 21. La intensidad de la luz actínica se ajustó a $200 \mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

El siguiente paso fue analizar la inducción del principal mecanismo de NPQ, relacionado con la proteína OCP (NPQ_{OCP}) siguiendo los modelos descritos de activación de esta proteína mediante el uso del Dual PAM-100 (Wilson et al., 2006, 2007). Para ello, las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor se sometieron a la técnica de pulsos saturantes en presencia de luz actínica azul.



RESULTADOS

Inicialmente, las células se adaptaron a oscuridad (15 minutos), se les aplicó una intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y se realizaron pulsos saturantes cada 20 s (Figura 50A). Una vez que la fluorescencia máxima o F_{ma} se encuentra estable, se aumentó la intensidad lumínica a 750 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para obtener la fluorescencia máxima en alta intensidad, definida como F_{ma}' , que permite el cálculo del $\text{NPQ}_{\text{OCP}} [(F_{ma} - F_{ma}')/F_{ma}']$.

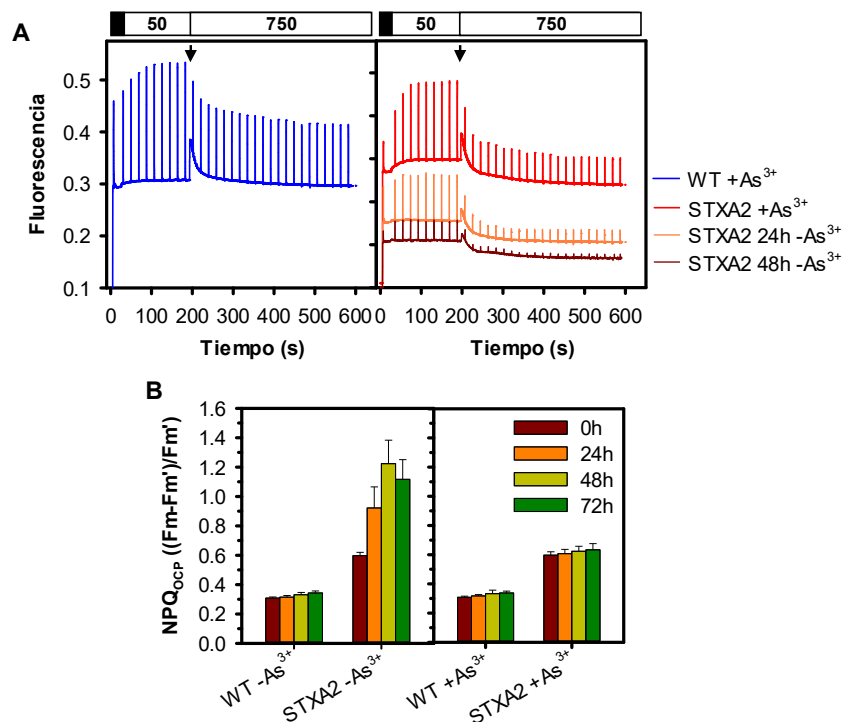


Figura 50. Respuesta a alta luz dependiente de OCP. (A) Disminución de la fluorescencia máxima inducida por el NPQ mediado por OCP (NPQ_{OCP}) tras un cambio en la intensidad de la luz actínica azul. Las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento en presencia de arsenito (0 horas) y tras su retirada, se ajustaron a $2\cdot 10^7$ células· ml^{-1} y se utilizaron para una inducción de la fluorescencia como se detalla en la figura 21. La intensidad de la luz actínica azul cambió de 50 a 750 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (indicado por una flecha). **(B)** Niveles del NPQ_{OCP} en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de arsenito, donde F_{ma} representa la fluorescencia máxima en 50 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y F_{ma}' la fluorescencia tras 5 minutos en 750 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ obtenidos de A. El tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados se muestran en la Figura 50B y en todos los casos se puede ver una inducción del NPQ_{OCP} , aunque se observan grandes diferencias entre las estirpes WT y STXA2. En la estirpe STXA2 con arsenito ya se observan mayores niveles en el NPQ_{OCP} con respecto al WT en respuesta a altas intensidades lumínicas, mientras que la retirada de arsenito del medio produce un aumento en el NPQ_{OCP} , alcanzando el máximo nivel a las 48 horas (Figura 50B).



4. TrxA afecta a distintos procesos celulares metabólicos y morfológicos

4.1 Cambios morfológicos asociados a una limitación en el crecimiento

Las diferencias observadas en la estirpe STXA2 en los niveles de clorofila y ficobiliproteínas nos llevó a analizar la estirpe STXA2 mediante microscopía óptica y de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Figura 51.

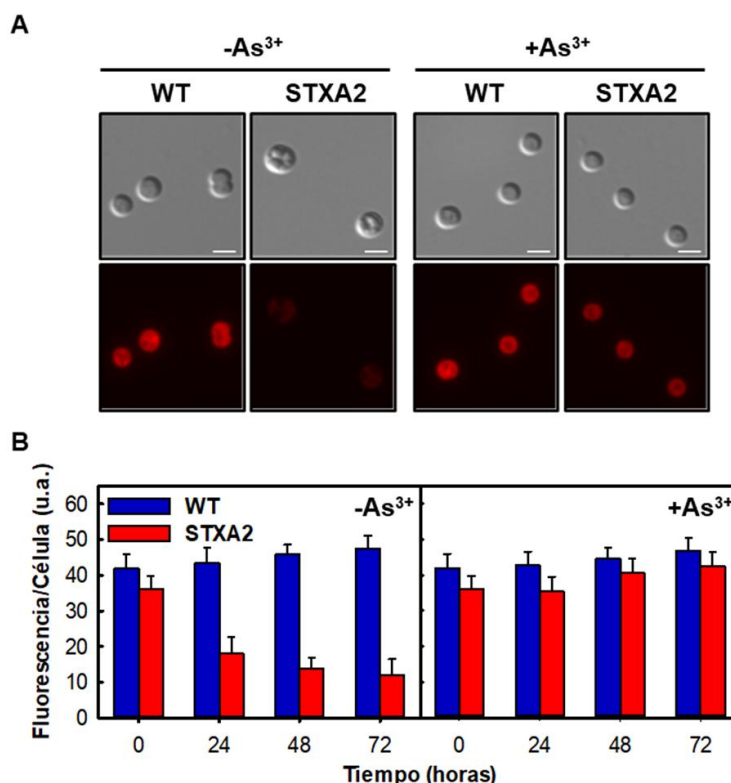


Figura 51. Análisis mediante microscopía óptica y de fluorescencia de la estirpe STXA2. (A) Fotografías de células de las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor y pasadas 48 horas de su eliminación, tomadas con un microscopio de fluorescencia Leica DM6000 en las modalidades de campo claro y fluorescencia. (B) Cuantificación de la fluorescencia durante una cinética estándar de crecimiento. El tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos. Los datos obtenidos con el microscopio de fluorescencia se analizaron mediante el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 51A, no se producen cambios en la morfología de la estirpe STXA2 en presencia de arsenito con respecto a la estirpe WT. Sin embargo, pasadas 48 horas de la retirada del arsenito y la consiguiente disminución de TrxA se observan numerosos cambios morfológicos en STXA2. Además, en las imágenes con el microscopio de fluorescencia se observa una pérdida en la autofluorescencia de la estirpe STXA2 después de la retirada de arsenito y a lo largo de la cinética de crecimiento (Figuras 51A y 51B), como consecuencia de la pérdida de clorofila y



RESULTADOS

ficobiliproteínas. La microscopía óptica permite observar en STXA2 la presencia de gránulos en el interior celular y un aumento en el tamaño celular en comparación a las estirpes WT y STXA2 con arsenito (Figura 51A). Cuando se mide el tamaño de las células utilizando el software ImageJ se confirman estos resultados (Figura 52A).

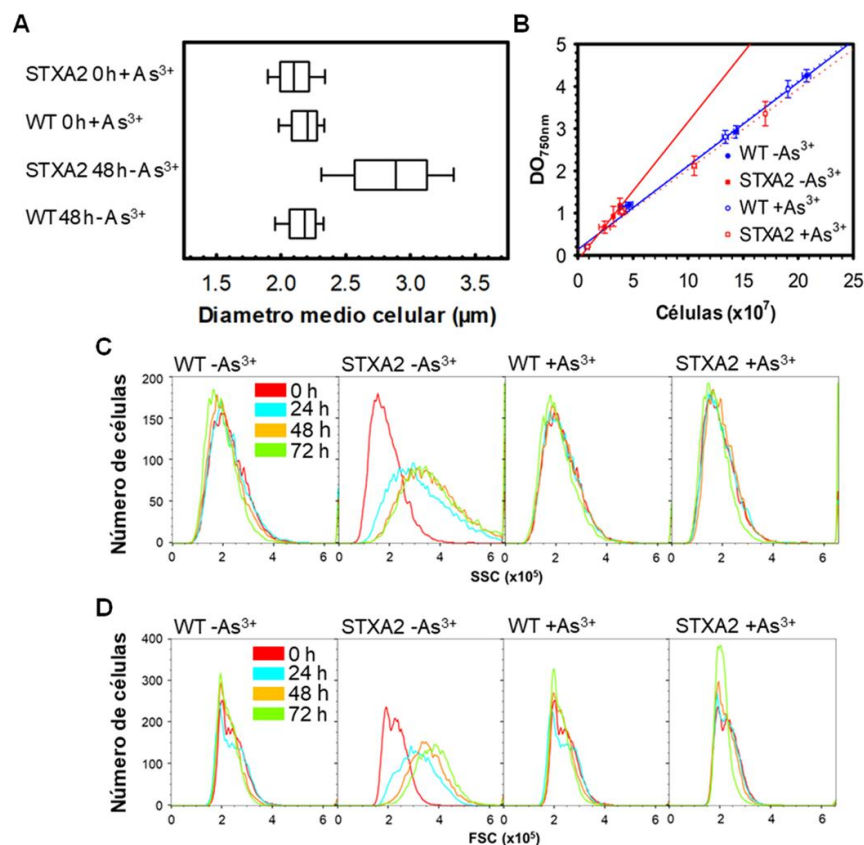


Figura 52. Cambios morfológicos en la estirpe STXA2 dependiente de los niveles de TrxA. (A) Cálculo del tamaño celular mediante microscopía óptica. Se midieron 150 células de cinéticas independientes del WT y STXA2 en las condiciones estándar de crecimiento y en presencia de arsenito (0 horas) y tras 48 horas sin arsenito, para cada una de las estirpes utilizando ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Relación entre el número de células y $DO_{750\text{nm}}$ durante una cinética estándar de crecimiento en presencia y en ausencia de arsenito, analizados mediante el citómetro de flujo (C) Complejidad celular (SSC) analizada mediante el citómetro de flujo. (D) Tamaño celular (FSC) analizado mediante el citómetro de flujo. Células de WT y STXA2 durante las cinéticas se utilizaron para el análisis en C y D. El tiempo 0 horas es en presencia de arsenito en todos los casos.

Debido a los cambios en la morfología de las células en la estirpe STXA2 se planteó establecer la relación entre el número de células y la $DO_{750\text{nm}}$ de las estirpes durante una cinética estándar de crecimiento mediante el uso del citómetro de flujo (Figura 52B). Además, el citómetro permitió la cuantificación del tamaño celular (FSC) (Figura 52C) y la complejidad celular (SSC) (Figura 52D). En la estirpe STXA2 en presencia de inductor no se observan diferencias significativas de estos parámetros con



RESULTADOS

respecto a la estirpe WT. Cuando retiramos el inductor del medio, se observó en la estirpe STXA2 una pérdida de la relación lineal con respecto a la estirpe WT, obteniéndose para el mismo valor de DO_{750nm} un menor número de células (Figura 52B). Además, se observa en STXA2 y en estas condiciones un aumento progresivo en la complejidad y en el tamaño celular (Figura 52C y 52D).

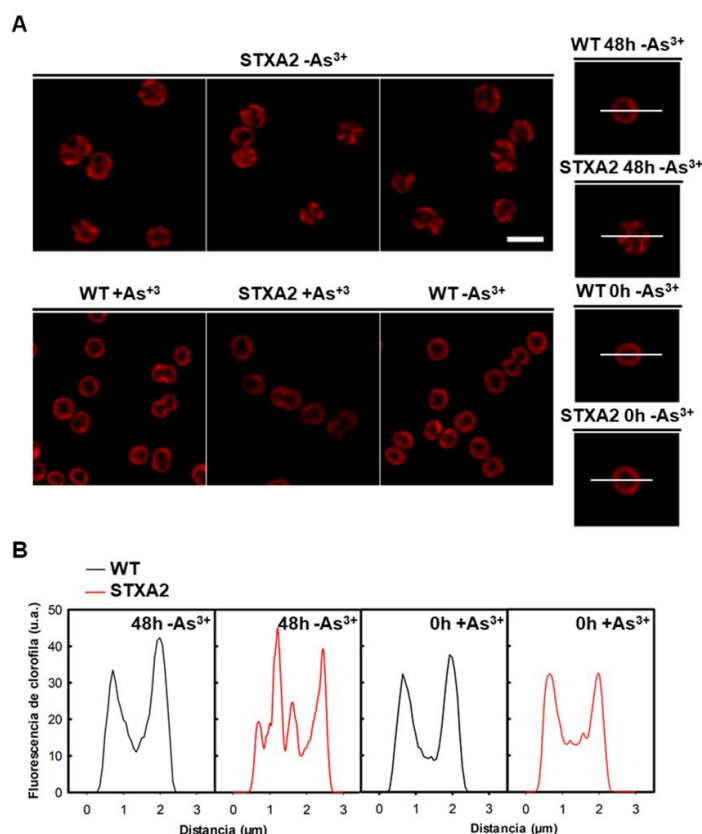


Figura 53. Distribución de los complejos captadores de luz. (A) Imágenes de las células de las estirpes WT y STXA2 mediante un microscopio de fluorescencia confocal. Barra blanca = 3 µm. **(B)** Perfiles de intensidad de la autofluorescencia de las células observadas en A mediante ImageJ, siguiendo la línea blanca sobre las células representadas en A.

Las autofluorescencia de la clorofila se analizó en la estirpe STXA2 utilizando también un microscopio confocal. En el caso de la estirpe WT y STXA2 en presencia de inductor, la señal de la autofluorescencia está prácticamente restringida a la periferia de las células, exhibiendo una organización típica del tilacoide (Figuras 53A y 53B). Ambas estirpes presentan las láminas tilacoidales ordenadas en la periferia celular y con zonas de convergencia junto a la membrana plasmática (Figuras 53A y 53B). En el mutante STXA2 después de 48 horas de la eliminación del inductor, la autofluorescencia parece estar distribuida uniformemente a lo largo de las células (Figuras 53A y 53B).



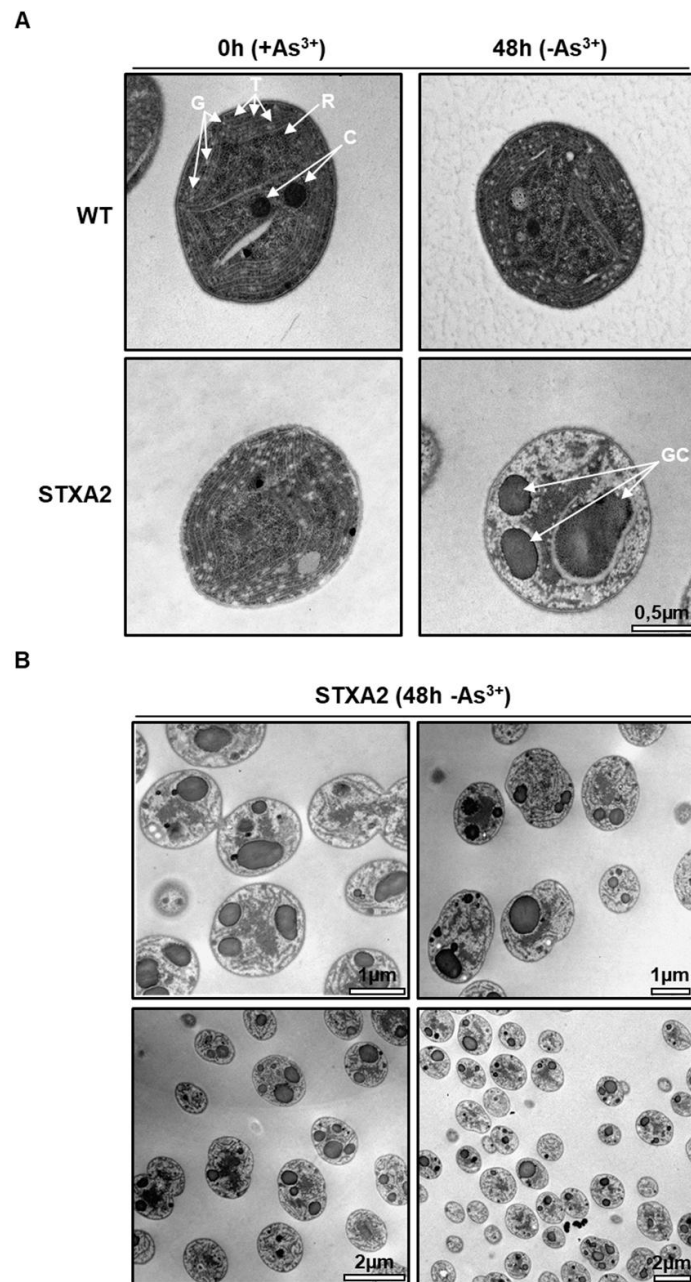


Figura 54. Ultraestructura de las estirpes WT y STXA2 mediante microscopía electrónica. (A) Imágenes de microscopía electrónica de las estirpes WT y STXA2 en las condiciones estándar de crecimiento y en presencia de arsenito (0 horas) y tras 48 horas sin arsenito. Los componentes intracelulares marcados corresponden a la membrana tilacoidal (T), los carboxisomas (C), los gránulos de glucógeno (G) y de cianoficina (GC), y los ribosomas (R). (B) Diferentes imágenes de la estirpe STXA2 después de 48 horas sin arsenito.

Para analizar la ultraestructura celular se utilizó la microscopía electrónica (ver detalles en el apartado III.4.8.3). Tal y como se muestra en la Figura 54, la estirpe



RESULTADOS

mutante después de 48 horas sin inductor presenta una drástica disminución en la densidad de los electrones respecto a las estirpes WT y STXA2 en presencia de arsenito. Esta diferencia se debe fundamentalmente a una disminución de las membranas tilacoidales y a una desorganización de la ultraestructura del interior celular.

En la estirpe STXA2, la disminución y desorganización masiva del sistema de membranas tilacoidal va acompañada de un incremento de pequeños gránulos ampliamente distribuidos (tamaño de 20-40 nm), y varios gránulos ocupando gran parte del volumen celular (tamaño de 200-600 nm), que corresponden a gránulos de glucógeno y cianoficina respectivamente (Figura 54A). Los carboxisomas, con forma poliédrica, son fácilmente distinguibles en las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor, pero sólo se observan en algunas células de STXA2 sin arsenito (Figura 54B). Por último, las estirpes WT y STXA2 con arsenito presentan ribosomas repartidos por todo el interior celular, predominando cerca de las membranas tilacoidales. En la estirpe STXA2 sin arsenito, la mayoría de las células presentan una menor densidad de electrones posiblemente relacionada, además de la disminución de las membranas tilacoidales, con una reducción considerable en el número de ribosomas. Es posible observar células donde prácticamente no se visualizan ribosomas (Figuras 54A y 54B).

4.2 Acumulación de polímeros de reserva, cianoficina y glucógeno

Existen diferentes condiciones nutricionales que producen limitaciones en el crecimiento e inducen la acumulación de polímeros de reserva de carbono y nitrógeno, que desempeñan una función importante en la homeostasis energética (Cano et al., 2018). De acuerdo con lo observado a través del análisis de microscopía electrónica, se midieron las cantidades de glucógeno y de cianoficina, principales reservorios de carbono y nitrógeno intracelular, en las estirpes WT y STXA2.

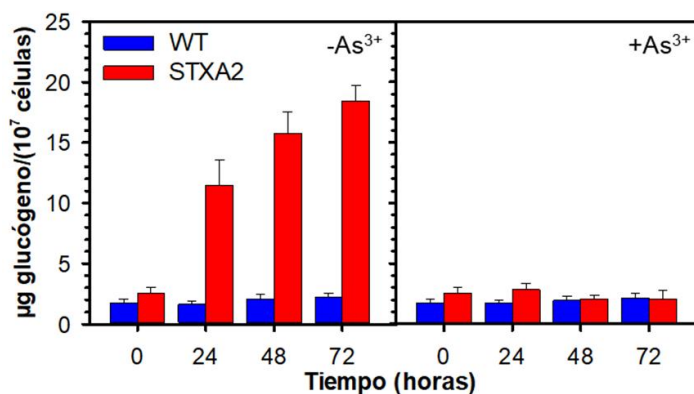


Figura 55. Niveles de glucógeno de las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor. Determinación del contenido de glucógeno en las estirpes WT y STXA2 cultivadas en condiciones estándar de crecimiento en ausencia y presencia de arsenito. El tiempo 0 horas



RESULTADOS

corresponde a los niveles de glucógeno en presencia de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El contenido de glucógeno se analizó a lo largo de la curva de crecimiento de la estirpe STXA2 en presencia y ausencia de inductor. Como se observa en la Figura 55, la estirpe STXA2 en presencia de inductor acumula aproximadamente un 45% más de glucógeno respecto a la estirpe WT en fase exponencial (Figura 55, tiempo 0 horas). La retirada de arsenito del medio produce un incremento de glucógeno a lo largo del tiempo en la estirpe STXA2, que es muy acentuado en las primeras 24 horas (Figura 55). En concreto, los niveles en la estirpe STXA2 aumentan hasta 6 veces después de 48 horas con respecto a los niveles iniciales.

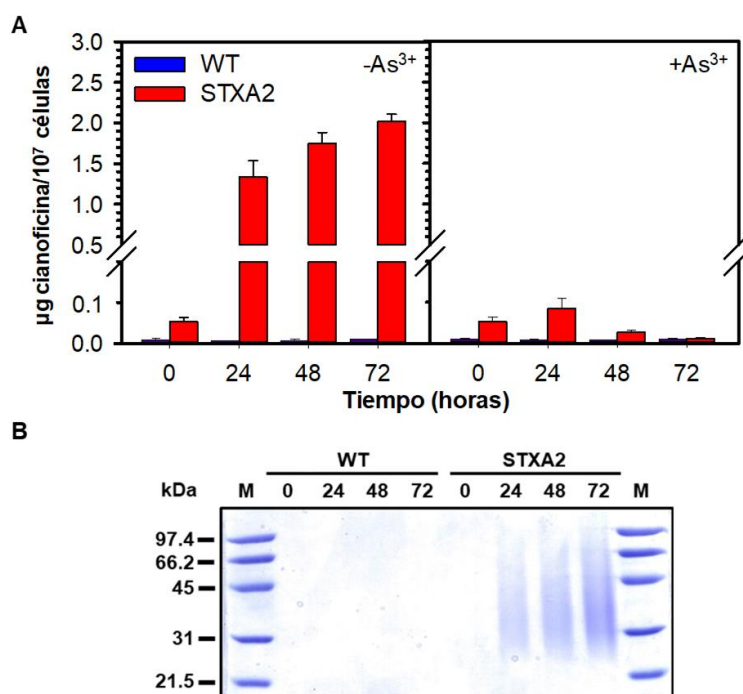


Figura 56. Niveles de cianoficina en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de inductor. (A) Determinación del contenido en cianoficina en las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento en presencia y ausencia de arsenito. El tiempo 0 horas corresponde a los niveles de cianoficina en presencia de arsenito. **(B)** Electroforesis en gel SDS-PAGE de la cianoficina aislada. Se tomaron 15 μl de los gránulos de cianoficina purificados a partir de 10⁷ células, se añadieron 5 μl de tampón de carga 4X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20%, SDS 4% y azul de bromofenol 0.005%), y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 12%. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó con Coomassie blue R250.

Cuando se analizan los niveles de cianoficina en la estirpe STXA2 en presencia de inductor, estos son aproximadamente 4 veces superior con respecto a la estirpe WT (Figura 56A). Esta diferencia, junto al nivel de glucógeno, no representan unos niveles significativamente importantes con respecto a otros componentes celulares, como se observa mediante microscopía electrónica, aunque ponen de manifiesto una pequeña



limitación con respecto a la estirpe WT. Cuando se elimina el inductor del medio de cultivo, en la estirpe STXA2 podemos observar un aumento de los niveles de cianoficina de hasta 40 veces, desde $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g}/10^7$ células hasta $2.02 \pm 0.09 \mu\text{g}/10^7$ células (Figura 56A). Además, la cianoficina, compuesta por arginina y aspártico, es posible visualizarla en la estirpe STXA2, después de retirar el inductor, mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y presenta una masa molecular estimada de 25-100 kDa (Figura 56B). Esta situación indicaría una limitación en el crecimiento y una capacidad fotosintética que persiste, redirigiendo el flujo de carbono y nitrógeno hacia los polímeros de reserva.

4.3 Limitación de la traducción de proteínas en STXA2

Una de las principales situaciones donde se ha descrito un incremento en los niveles de cianoficina, es cuando existe una limitación en la síntesis de proteínas (Allen et al., 1980). Utilizando inhibidores como el cloranfenicol o la lincomicina, y en presencia de nitrógeno marcado (^{14}N y ^{15}N) se puede determinar cómo, después de 24 horas en presencia del inhibidor, el 40% de la cianoficina está formada a partir de la degradación de proteínas y un 60% del nitrógeno procedente del medio, aumentando el porcentaje del nitrógeno del medio utilizado en el tiempo (Allen et al., 2005). Este polímero también se acumula en condiciones de estrés lumínico o limitación de nutrientes como sulfato, fosfato o potasio (Allen et al., 1980; Watzer et al., 2015).

Para determinar si los efectos morfológicos y la acumulación de polímeros podrían estar relacionados con la traducción de proteínas, se determinaron los niveles de proteínas en la estirpe STXA2 en ausencia de inductor. Como se observa en la Figura 57, la retirada del inductor produce en la estirpe STXA2 una disminución progresiva en la cantidad de proteína total durante la cinética estándar de crecimiento. Después de 48 horas sin arsenito, la cantidad de proteína total disminuye hasta aproximadamente un 40% con respecto a la estirpe WT.

Por otro lado, las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor presentan unos niveles de proteína total prácticamente constantes durante la cinética estándar de crecimiento (Figura 57).



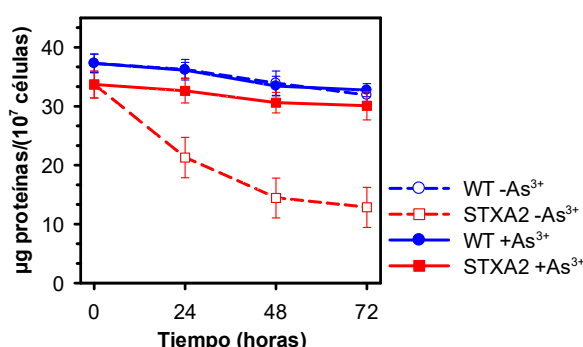


Figura 57. Cuantificación de la cantidad total de proteínas solubles en las estirpes WT y STXA2 en presencia y ausencia de arsenito. Determinación del contenido en proteínas en las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento en presencia y ausencia de inductor. El tiempo 0 horas corresponde a los niveles de proteínas en presencia de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Estos resultados nos llevaron a analizar la tasa de síntesis de proteínas mediante marcaje de proteínas recién sintetizadas con ³⁵S-Metionina y ³⁵S-Cisteína radiactiva (³⁵S-Met/Cys), como se describe en el apartado III.3.9.

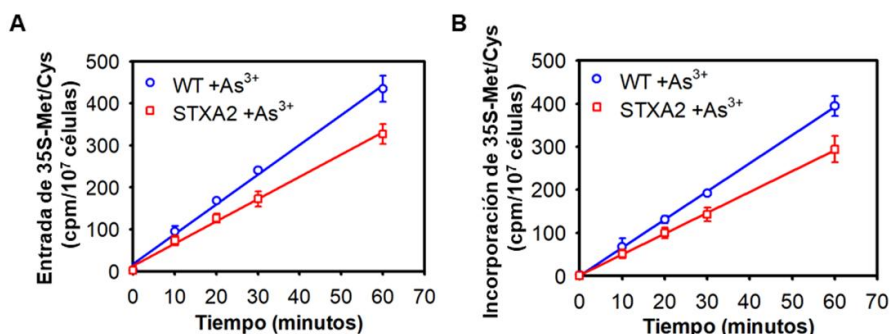


Figura 58. Tasa de traducción a proteínas en WT y STXA2 en presencia de inductor. Incorporación de ³⁵S-Met/Cys en el interior celular (A) e incorporación de ³⁵S-Met/Cys en proteína total (B). A 2·10⁷ células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento y arsenito en el medio, se les añadió ³⁵S-Met/Cys en los tiempos indicados, y se cuantificaron los niveles de ³⁵S-Met/Cys mediante un contador de centelleo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

En una primera fase, se midió la entrada e incorporación de ³⁵S Met/Cys en las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor durante 60 minutos. Para ello, se tomaron muestras de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en condiciones estándar de crecimiento y se incubaron con ³⁵S-Met/Cys en los tiempos indicados, manteniendo las condiciones estándar de crecimiento (Figura 58). Los resultados muestran que la estirpe STXA2 presenta una menor entrada de ³⁵S-Met/Cys en la célula y una menor incorporación de ³⁵S-Met/Cys en proteínas, un 15-20% aproximadamente con respecto a la estirpe WT (Figuras 58A y 58B). El pequeño retraso en el crecimiento de la estirpe mutante STXA2 con arsenito podría explicarse por una limitación inicial de la síntesis de



RESULTADOS

proteínas, reajustando posteriormente la disponibilidad de aminoácidos en el entorno de los ribosomas. Además, estos resultados evidencian una correcta integración entre la entrada de aminoácidos al interior celular y su incorporación en proteínas mediante la maquinaria de síntesis de proteínas, manteniendo una concentración intracelular de aminoácidos constante en el tiempo.

Para el análisis de una cinética completa con las estirpes WT y STXA2 se seleccionaron los tiempos de 30 y 60 minutos de incubación con ^{35}S -Met/Cys, obteniendo unos resultados similares en ambos casos. Para ello, se tomaron muestras de células de las estirpes WT y STXA2 con arsenito y después de la retirada del mismo (24, 48 y 72 horas), y se analizó la ^{35}S -Met/Cys presente en el interior celular y la ^{35}S -Met/Cys incorporada como proteína (Figura 59).

En la estirpe STXA2, la retirada del inductor del medio de cultivo produce una fuerte disminución en la entrada de ^{35}S -Met/Cys al interior celular, y en los niveles de ^{35}S -Met/Cys incorporada a proteínas (Figura 59A). Los niveles de entrada al interior celular disminuyen desde 162.76 ± 3.07 cpm/ 10^7 células hasta 39.31 ± 6.12 y 17.58 ± 4.21 cpm/ 10^7 células después de 24 y 48 horas respectivamente (Figura 59A). Esto implica que cuando los niveles de TrxA disminuyen por debajo del 2% después de 48 horas, se observa una disminución de 10 veces en los niveles intracelulares de ^{35}S -Met/Cys. Respecto a los niveles de ^{35}S -Met/Cys incorporados en proteínas, estos disminuyen 21 veces tras 48 horas sin inductor, desde 133.64 ± 2.68 a 6.52 ± 1.73 cpm/ 10^7 células (Figura 59A). La relación entre la ^{35}S -Met/Cys incorporada a proteínas frente a la ^{35}S -Met/Cys existente en las células en la estirpe STXA2 después de 48 horas, pasa del 82% al 37% aproximadamente (Figura 59B).

Para confirmar que la disminución en la entrada de estos aminoácidos al interior celular está relacionada con la parada en la síntesis de proteínas, se realizaron experimentos de inhibición artificial de la síntesis de proteínas utilizando lincomicina. Para ello, se tomaron muestras de la estirpe WT en diferentes tiempos (0, 60, 120 y 180 minutos) con lincomicina (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final), y se incubaron durante 30 minutos con ^{35}S -Met/Cys. Los resultados se muestran en la Figura 59C donde se observa como la adición de lincomicina a la estirpe WT produce una disminución del 98% aproximadamente en la incorporación de ^{35}S -Met/Cys a proteínas. Además, se observa una disminución progresiva en la incorporación de ^{35}S -Met/Cys al interior celular del WT cuando se incuba durante más tiempo con lincomicina (Figura 59C). Estos datos ponen de manifiesto que existe una relación entre la síntesis de proteínas con los niveles y el transporte de aminoácidos. La adición de lincomicina sobre el mutante STXA2 después de 48 horas sin arsenito, redujo los niveles de entrada e incorporación a proteína,



indicando que todavía existe síntesis de proteínas, aunque residual (datos no mostrados).

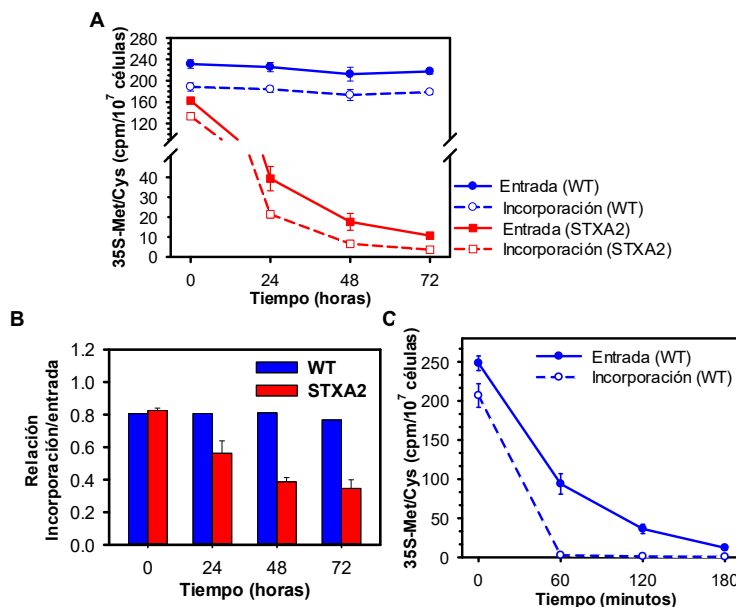


Figura 59. Evolución de la tasa de traducción de proteínas en WT y STXA2 tras la retirada de arsenito del medio. (A) Niveles de ³⁵S-Met/Cys en el interior celular (entrada) y en proteína total (incorporación). Las células de las estirpes WT y STXA2 en condiciones estándar de crecimiento y arsenito en el medio, se lavaron e inocularon sin arsenito en el medio. Las cuantificaciones se realizaron tras incubar 30 minutos en presencia de ³⁵S-Met/Cys y cuantificar los niveles de ³⁵S-Met/Cys mediante un contador de centelleo. **(B)** Relación entre la incorporación en proteínas y los niveles celulares de ³⁵S-Met/Cys. Los datos se obtienen a partir de A. **(C)** Niveles de ³⁵S-Met/Cys en el interior celular (entrada) y en proteína total (incorporación) de la estirpe WT tras incubar con lincomicina (250 µg/ml final) en los tiempos indicados y en las mismas condiciones que en A. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

La situación observada en la estirpe STXA2 cuando no hay inductor y por lo tanto, cuando los niveles de TrxA comienzan a disminuir por debajo del 10% implicaría un aparente bloqueo de la síntesis de proteínas, que conlleva una limitación en el crecimiento celular y a la acumulación de un polímero de reserva rico en carbono y nitrógeno como es la cianoficina. Estos resultados plantearon la posibilidad de que se produjeran fuertes cambios en la concentración de aminoácidos libres, por lo que se decidió analizar los niveles de estos en las estirpes WT y STXA2 durante una cinética estándar de crecimiento en presencia y ausencia de arsenito.



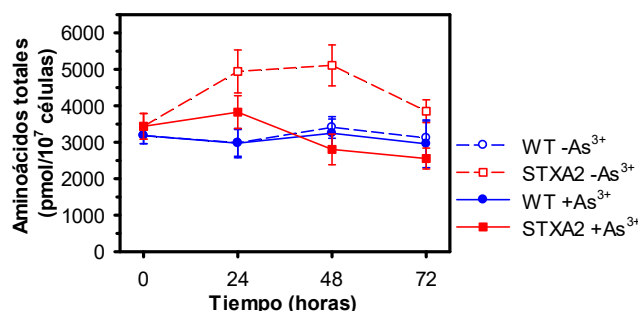


Figura 60. Cuantificación de aminoácidos libres totales en las estirpes WT y STXA2. Los niveles de aminoácidos se calcularon a partir de la suma de los aminoácidos libres identificados mediante HPLC. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La identificación y cuantificación de los aminoácidos se llevó a cabo mediante HPLC (ver detalles en el apartado III.3.8). Cuando se representa la concentración de aminoácidos libres presentes en las diferentes estirpes se observa que la estirpe STXA2 en presencia de inductor presenta un *pool* de aminoácidos totales mayor que la estirpe WT durante la fase exponencial (Figura 60, 0 y 24 horas). Una vez superada la fase exponencial, los niveles de aminoácidos en esta estirpe disminuyen hasta alcanzar valores incluso por debajo de la estirpe WT (Figura 55, 48 y 72 horas). La retirada del inductor del medio produce un incremento del 43% aproximadamente del *pool* durante las primeras 24 horas y del 50% después de 48 horas con respecto a los valores iniciales. A pesar de esto, el aumento en los niveles de aminoácidos es mucho menor que la disminución observada en la incorporación en proteína de ³⁵S-Met/Cys posiblemente debido a la redirección del nitrógeno hacia la cianoficina.

El análisis del perfil de aminoácidos libres en la estirpe WT y STXA2 se muestra en la Figura 61. En el caso de la estirpe WT, el perfil es similar al descrito en estudios anteriores (Iijima et al., 2015; Kiyota et al., 2014; Vavitsas et al., 2017) tanto en presencia como en ausencia de inductor. Sin embargo, la estirpe STXA2 en presencia de inductor (t=0 horas) muestra niveles superiores de los aminoácidos aspártico, serina, glicina, alanina, valina y leucina, presentando todos ellos valores que oscilan entre 150-250% respecto a la estirpe WT. Estos aminoácidos alcanzan valores similares a la estirpe WT después de 48 horas, una vez superada la fase exponencial de crecimiento, y con tasas de crecimiento, tasas de fotosíntesis y de fijación de carbono menores respecto a la fase exponencial (datos no mostrados). Sólo los aminoácidos triptófano, fenilalanina y metionina presentan niveles inferiores de manera significativa con respecto a los obtenidos en el WT. En el caso del triptófano es un 50% menor y en el caso de la fenilalanina y la metionina, un 15% (Figura 61).



RESULTADOS

La retirada del inductor del medio en la estirpe STXA2, con la consiguiente disminución progresiva de los niveles de TrxA, produce diferencias en los niveles de algunos aminoácidos. Los aminoácidos serina, glicina y alanina aumentan sus niveles hasta 4-5 veces, mientras que valina y leucina aumentan 2-3 veces con respecto al tiempo inicial (Figura 61). Además, se observa como algunos aminoácidos que no presentan diferencias entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor, también presentan un incremento de hasta 2-3 veces respecto al tiempo inicial, principalmente los aminoácidos treonina, glutamina, isoleucina o asparragina. El mayor incremento se observa después de 24-48 horas sin arsenito. Finalmente, algunos aminoácidos disminuyen sus niveles después de 72 horas sin arsenito, como el glutámico, aminoácido mayoritario en las células de *Synechocystis* (Figura 61). Por último, es importante destacar que no se producen disminuciones drásticas en ningún aminoácido concreto que pudiese comprometer la síntesis de proteínas.

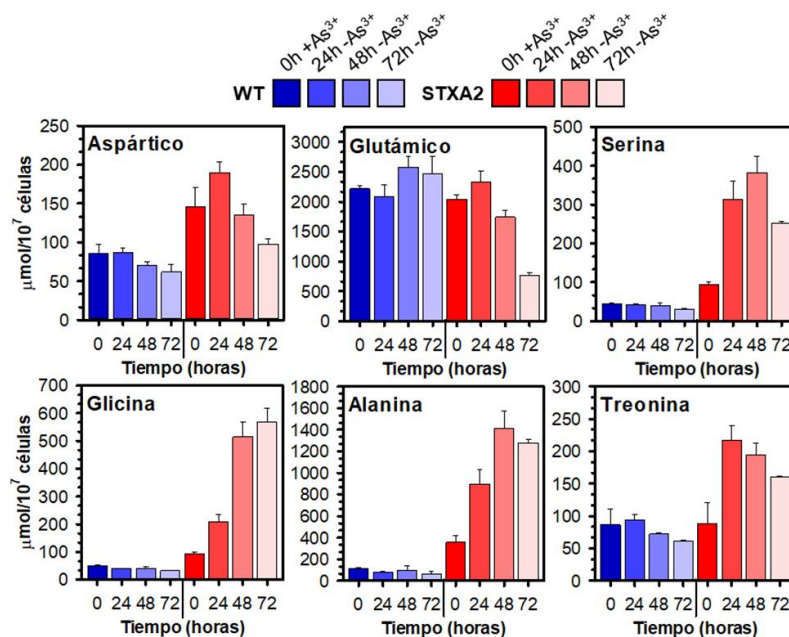


Figura 61. Cambios en los aminoácidos libres identificados en las estirpes WT y STXA2. Las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito en el medio, se lavaron e inocularon en medio nuevo BG11C en ausencia de arsenito. El tiempo 0 horas corresponde a los niveles de los aminoácidos antes de lavar, en presencia de 1 mM de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.



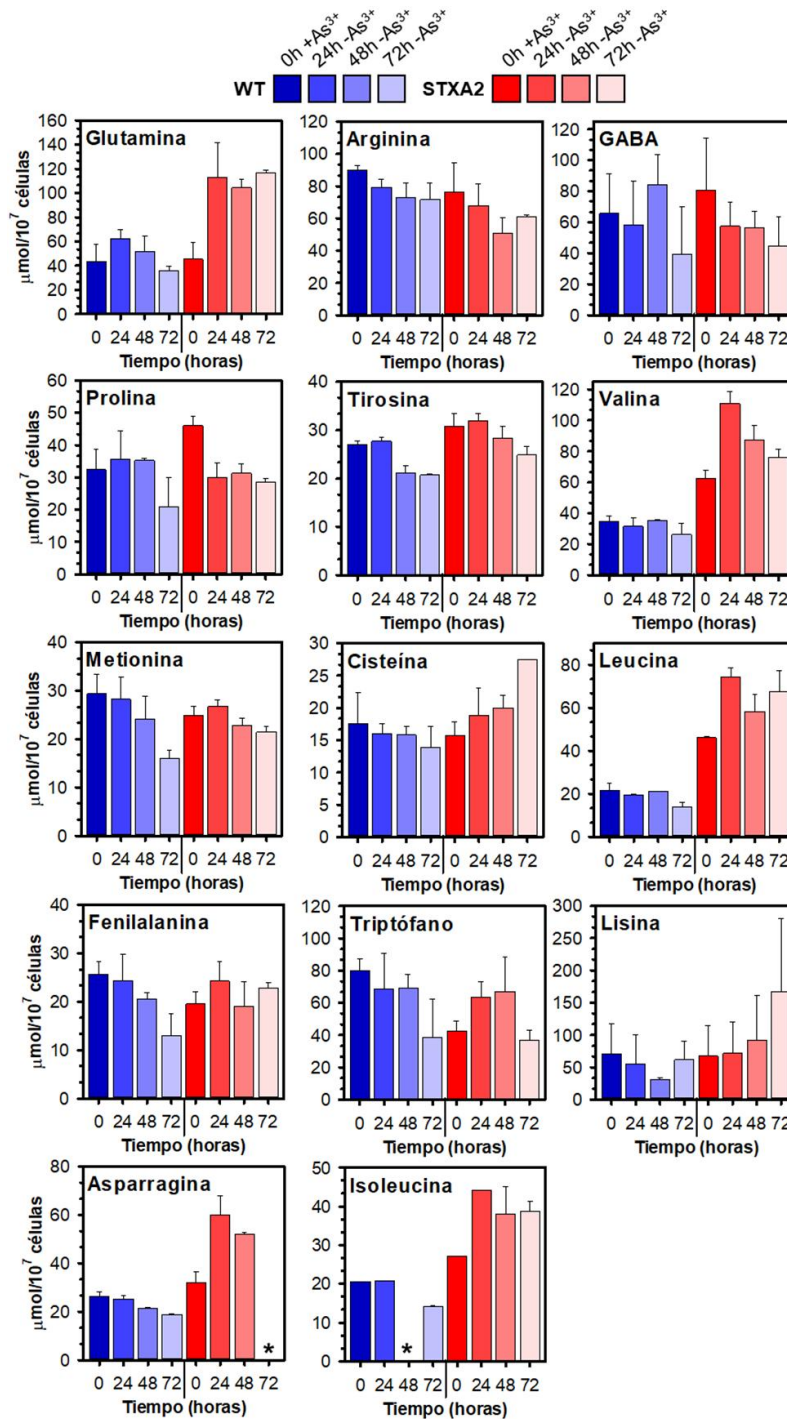


Figura 61 (cont.). Cambios en los aminoácidos libres identificados en las estirpes WT y STXA2. Las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito en el medio, se lavaron e inocularon en medio nuevo BG11C en ausencia de arsenito. El tiempo 0 horas corresponde a los niveles de los aminoácidos antes de lavar, en presencia de arsenito. Los aminoácidos no detectados se indican con un asterisco (*). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.



5. La adición de inductor permite la recuperación de la estirpe STXA2

Como se ha descrito anteriormente, la retirada de inductor del medio produce una serie de cambios relacionados con la disminución en los niveles de TrxA, y que producen una limitación en numerosos procesos celulares que parecen provocar un cambio desde el metabolismo anabólico hacia un estado de mantenimiento celular. La estirpe STXA2 cuando se cultiva en ausencia de inductor entra en un estado de latencia que puede mantenerse desde el día 2 y hasta 5-6 días después, una vez alcanzado este punto, la estirpe no es viable. Para analizar la cinética de recuperación de la estirpe STXA2, se añadió inductor después de 48 horas sin arsenito a las células de las estirpes WT y STXA2 cultivadas en las condiciones estándar de crecimiento. Además, se llevó a cabo el análisis de parámetros alterados en la estirpe STXA2 después de la adición de arsenito.

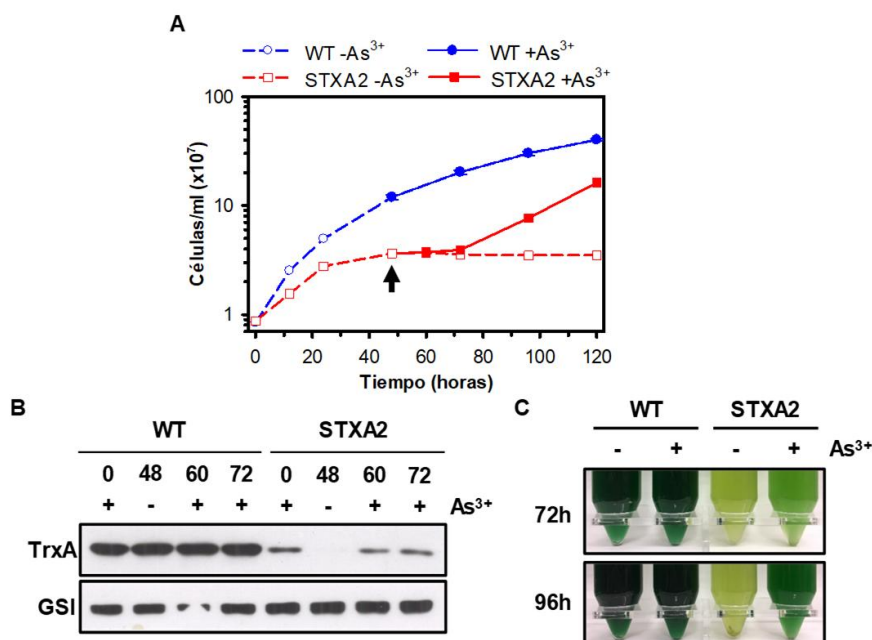


Figura 62. Efecto de la adición de arsenito en la estirpe STXA2 después de 48 horas y acumulación de TrxA. (A) Curva de crecimiento de las estirpes WT y STXA2 tras añadir arsenito de nuevo. Después de 48 horas sin arsenito, los cultivos se dividieron en dos y se añadió 1 mM de arsenito a uno de ellos, indicado por la flecha. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(B)** Análisis mediante Western blot de los niveles de TrxA durante la cinética de A. Como control de carga se utilizó la proteína GSI. **(C)** Fotografía de los cultivos de las estirpes WT y STXA2 tras 24 y 48 horas en presencia de arsenito en el medio de nuevo (72 y 96 horas en la cinética de A).

Al adicionar de nuevo el inductor al cultivo (Figura 62A, flecha negra), no se observa un aumento en el número de células durante las primeras 24 horas, indicando que no se produce división celular en la mayoría de estas. Sin embargo, pasadas 48 horas se observa un aumento en el número de células. El análisis mediante Western



RESULTADOS

blot permite observar la recuperación de los niveles de TrxA tras 12 horas con arsenito (Figura 62B). Además, se observa un cambio en el fenotipo de los cultivos después de 24 horas con arsenito, que corresponde a las 72 horas de la cinética completa (Figura 62C). Cuando se analizan los niveles de clorofila y ficobiliproteínas a lo largo del tiempo, no se observa un aumento significativo tras 6 horas del inicio de la recuperación (Figuras 63A y 63B, tiempo 54 horas). Sin embargo, tras 12 y 24 horas se observa un incremento que está relacionado con el cambio en el fenotipo de los cultivos en STXA2. En esta estirpe, y en relación al crecimiento observado, se observa cómo se recuperan los niveles de clorofila y ficobiliproteínas con respecto al inicio de la cinética (Figuras 63A y 63B).

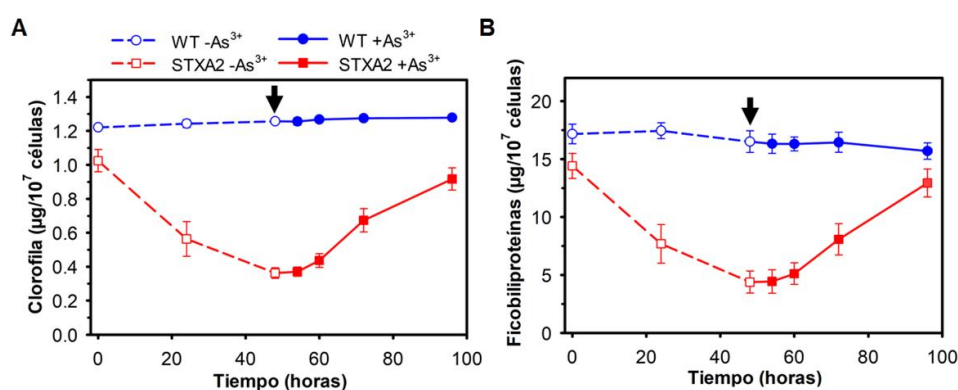


Figura 63. Medida del contenido de clorofila y ficobiliproteínas en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. (A) Contenido en clorofila o **(B)** ficobiliproteínas presente en 10^7 células en ausencia de arsenito y después de la adición de 1 mM de arsenito. La flecha indica el punto de adición de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

Numerosos estudios llevados a cabo en ausencia de nitrógeno han indicado la capacidad de células cloróticas en estado de “dormancia”, de utilizar los polímeros de reserva como el glucógeno para su recuperación (Klotz et al., 2016). Por ello, se planteó determinar si la estirpe STXA2 llevaría a cabo la movilización de los polímeros de reserva glucógeno y cianoficina acumulados en ausencia de arsenito, una vez inducida la expresión de TrxA. Se analizaron los niveles de estos polímeros en la estirpe STXA2 tras añadir el inductor (Figura 64). En ambos casos se observó una progresiva disminución del contenido de ambos polímeros en las células tras dicha adición, indicando que estos polímeros pueden jugar un papel determinante en el proceso de recuperación de la estirpe STXA2.



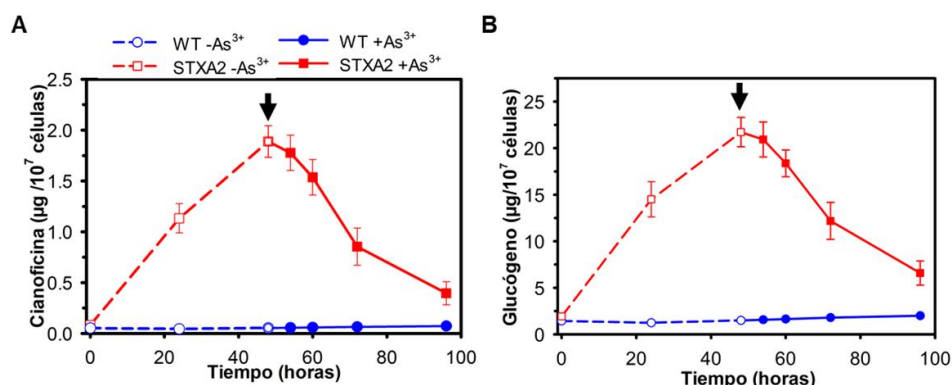


Figura 64. Determinación de los niveles de glucógeno y cianoficina de la estirpe STXA2 tras la adición de inductor. (A) Determinación de la cantidad cianoficina o **(B)** glucógeno referido a 10^7 células antes y después de añadir 1 mM de arsenito. La flecha indica el punto de adición de arsenito. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

El análisis mediante microscopía electrónica del proceso de recuperación de la estirpe STXA2 permite observar la disminución progresiva del contenido en glucógeno y cianoficina tras añadir arsenito de nuevo (Figura 65). Además, se observan membranas tilacoidales organizadas y carboxisomas después de 24 horas en presencia de arsenito (Figura 65, tiempo 72 horas). Los ribosomas, que aparecen como pequeñas partículas densas distribuidas por el citoplasma, aumentan durante la recuperación.

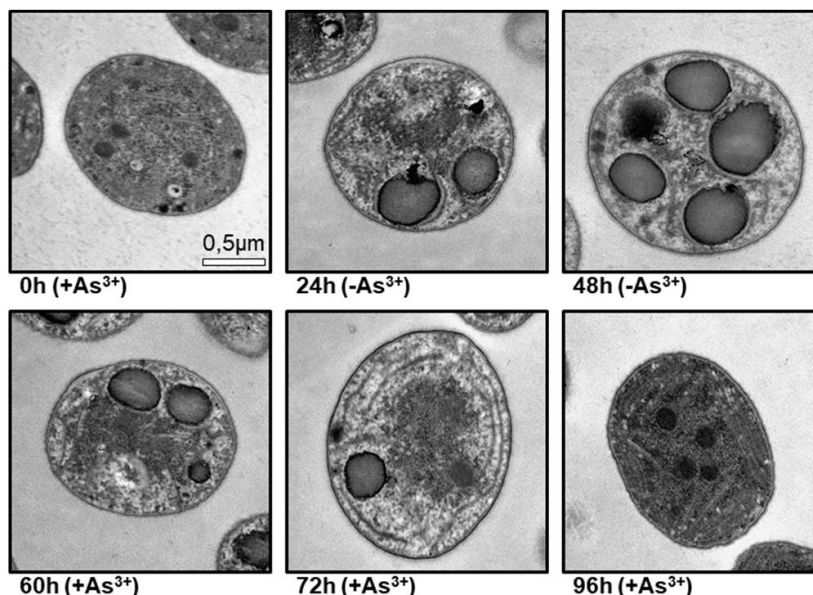


Figura 65. Ultraestructura la estirpe STXA2 tras la adición de inductor mediante microscopía electrónica. Imágenes de microscopía electrónica de la estirpe STXA2 en las condiciones estándar de crecimiento y en presencia de arsenito (0h +As³⁺), después de 48 horas sin arsenito (48h -As³⁺) y tras añadir arsenito de nuevo (60, 72 y 96h +As³⁺). La línea blanca equivale a 0.5 µm en todas las imágenes.



RESULTADOS

En el proceso de recuperación, la utilización de los polímeros de reserva debería reflejarse en un incremento de la actividad respiratoria de la estirpe. Para ello, se determinó la evolución de oxígeno en las condiciones descritas anteriormente. La estirpe STXA2 tras 48 horas sin arsenito presenta niveles bajos de producción de oxígeno comparado con la estirpe WT o con la estirpe STXA2 con inductor, la adición de arsenito al medio permite detectar un consumo de oxígeno a pesar de estar los cultivos iluminados (Figura 66). Después de 3 y 6 horas con arsenito en el medio, la estirpe STXA2 mantiene unos niveles de respiración constantes. Los niveles de producción de oxígeno por la actividad fotosintética solo son apreciables después de 24 horas (Figura 66). Este consumo de oxígeno tras añadir arsenito correlaciona con la movilización del glucógeno, principal fuente de carbono y energía en oscuridad, y de la cianoficina a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

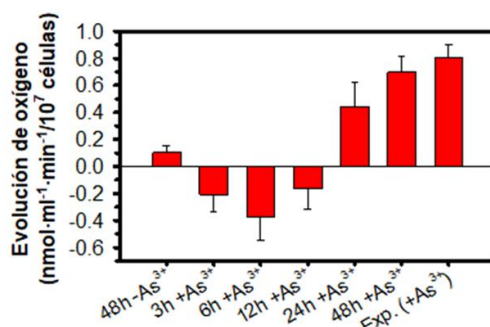


Figura 66. Evolución de oxígeno de la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. Tasa de consumo/producción de oxígeno en la estirpe STXA2 después de añadir 1 mM de arsenito a un cultivo con 48 horas sin arsenito. El cultivo de STXA2 en presencia 1 mM de arsenito en fase exponencial de crecimiento se utiliza como referencia Exp. (+As³⁺). Para la determinación de la evolución de oxígeno se utiliza una intensidad lumínica de luz de crecimiento (50 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹). Los resultados corresponden con la media de dos experimentos independientes.

Como se comentó anteriormente, cuando se miden los niveles de ATP en la estirpe STXA2 tras 48 horas sin inductor son muy bajos comparados con el WT, aunque parecen ser suficientes para mantener la viabilidad celular en los tiempos analizados. Tras la adición de arsenito al medio, la oxidación de carbohidratos y la respiración parecen ser los responsables de generar la energía necesaria para iniciar el proceso de recuperación en STXA2. Cuando se cuantifican los niveles de ATP en el proceso de recuperación se observa que después de 12 horas de la adición de arsenito, el nivel de ATP se incrementa de 5.99±2.41 a 13.38±3.22 pmoles/10⁷ células (Figura 67A). Este incremento inicial es posiblemente debido a la movilización de glucógeno. Los niveles de ADP y AMP presentan cambios, aunque en menor medida con respecto a los niveles de ATP (Figura 67A). Tras 48 horas, la restauración de la fotosíntesis permite que los valores de ATP sean similares a los obtenidos en la estirpe STXA2 en fase exponencial



RESULTADOS

en presencia de arsenito. El *pool* total de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) (Figura 67B) y la carga energética (Figura 67C) también recuperan los niveles tras 24 horas del proceso de recuperación.

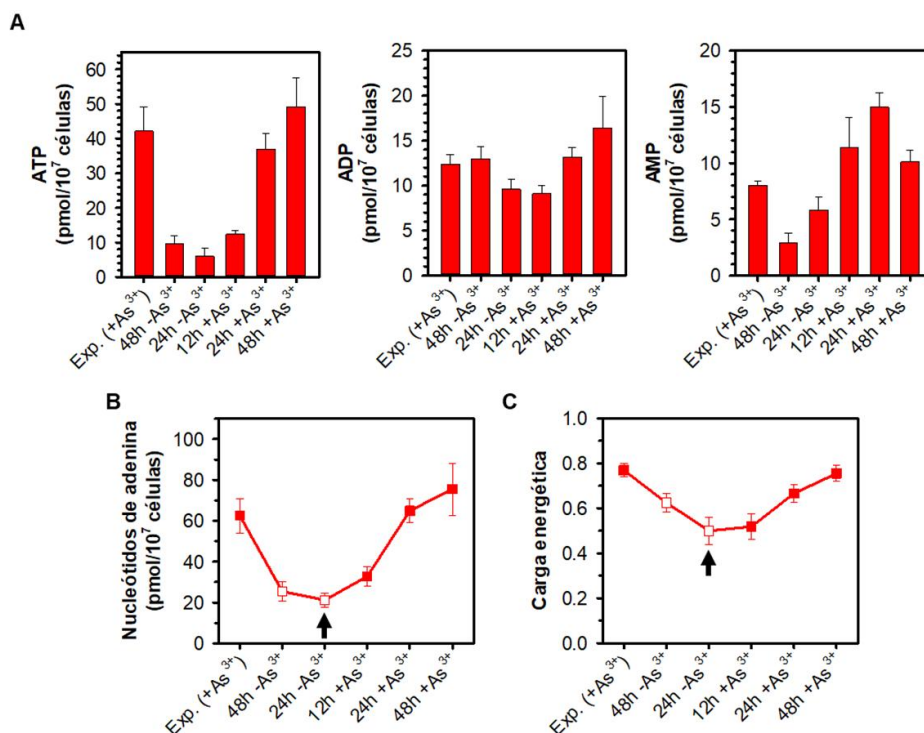


Figura 67. Medida de los niveles energéticos en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. Cuantificación de los niveles de ATP, ADP y AMP (A), nucleótidos totales de adenina (B) y carga energética (C) en la estirpe STXA2 cultivada durante 48 horas sin inductor y tras añadir 1 mM de arsenito al cultivo de nuevo. La flecha indica el punto de adición de arsenito en (B) y (C). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

La retirada del inductor en el medio de cultivo en la estirpe STXA2 produce una reducción en la traducción de proteínas como se observa en experimentos de marcaje radioactivo con ³⁵S-Met/Cys y en los niveles totales de proteínas (Figuras 57 y 59). A pesar de esto, la estirpe STXA2 sigue siendo viable en los tiempos analizados y responde a la adición de inductor, recuperando el fenotipo.

Como se ha comentado, tanto la movilización de polímeros de reserva como el aumento de ATP intracelular inicia el proceso de recuperación una vez que se añade inductor. En esta situación sería necesario el inicio de la síntesis de proteínas de nuevo. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un seguimiento simultáneo de la incorporación de ³⁵S-Met/Cys y de los niveles de proteínas totales durante el proceso de recuperación. Como se observa en la Figura 68A, los niveles de entrada e incorporación en proteínas



RESULTADOS

de ^{35}S -Met/Cys después de 48 horas sin inductor, son 10 y 22 veces inferiores respecto al inicio del experimento, con la estirpe STXA2 en presencia de arsenito. Además, se observa un 35% aproximadamente en la relación entre la incorporación en proteínas con respecto a la ^{35}S -Met/Cys incorporada dentro de la célula (Figura 68B). Tras 12 horas desde la adición de inductor de nuevo, no se observan diferencias significativas en la entrada de ^{35}S -Met/Cys al interior celular, aunque se produce un aumento del 27% aproximadamente respecto a la presencia de ^{35}S -Met/Cys en proteínas, produciendo un aumento en la relación entre la entrada y la incorporación de ^{35}S -Met/Cis (Figuras 68A y 68B).

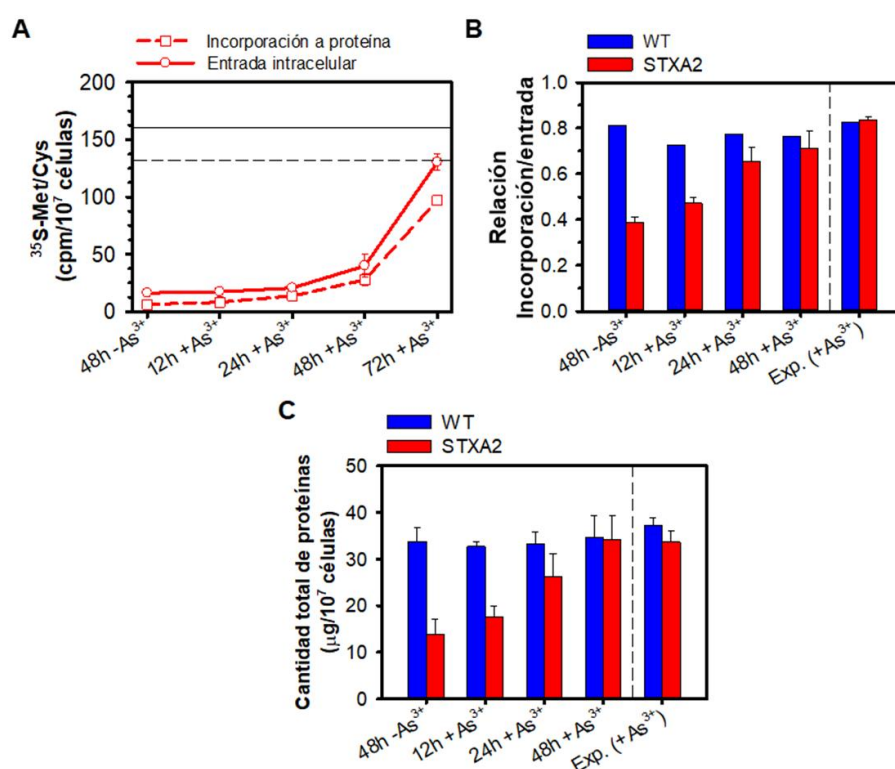


Figura 68. Evolución de la tasa de traducción de proteínas en STXA2 tras la adición del inductor. (A) Medida de los niveles de ^{35}S -Met/Cys en el interior celular (entrada) y en proteína total (incorporación) en la estirpe STXA2 cultivada durante 48 horas sin arsenito y tras añadir 1 mM del mismo al cultivo. La línea discontinua y continua indica los niveles de entrada e incorporación de la estirpe STXA2 en presencia 1 mM de arsenito y en fase exponencial. Las cuantificaciones se realizaron tras incubación 30 minutos en presencia de ^{35}S -Met/Cys y medir los niveles de ^{35}S -Met/Cys mediante un contador de centelleo. **(B)** Relación entre la incorporación en proteínas y los niveles intracelulares de ^{35}S -Met/Cys. **(C)** Cantidad total de proteínas en la estirpe STXA2 en las mismas condiciones que en B. El cultivo de la estirpe STXA2 en presencia 1 mM de arsenito en fase exponencial se utiliza como referencia (Exp. (+As³⁺)) en B y C. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en todos los casos.

A pesar de recuperar el fenotipo, los niveles de entrada e incorporación de ^{35}S -Met/Cys no alcanzan los valores iniciales hasta las 72 horas del periodo de recuperación



RESULTADOS

(Figura 68A). A diferencia de esto, la relación entrada/incorporación de ³⁵S-Met/Cys recupera prácticamente los valores presentes en las estirpes WT y SXTA2 en presencia de inductor y en fase exponencial, después de 24 horas (Figura 68B). Estos resultados parecen indicar que una vez que la estirpe STXA2 recupera los niveles de TrxA, utiliza la cianoficina, los aminoácidos intracelulares y el glucógeno para iniciar los procesos celulares centrales, además de activar la síntesis de proteínas. Por último, la cuantificación de los niveles de proteínas permite observar una progresiva recuperación en el contenido en proteínas tras la adición de inductor en la estirpe STXA2 (Figura 68C).

El análisis de los aminoácidos totales libres intracelulares muestra que los niveles iniciales se recuperan después de 48 horas de la inducción del gen *trxA* (Figura 69).

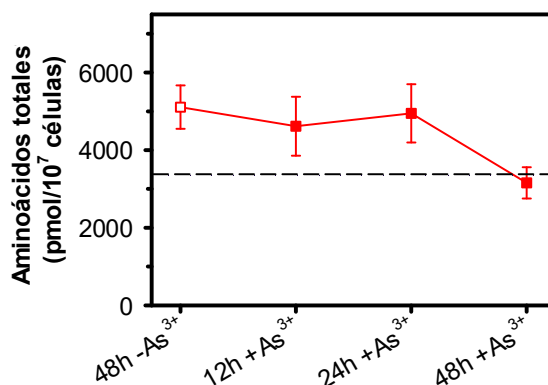


Figura 69. Cuantificación de aminoácidos libres totales en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. La línea discontinua indica los niveles de un cultivo de STXA2 en presencia 1 mM de arsenito en fase exponencial. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cuando se analizan los niveles de los 20 aminoácidos tras la adición de arsenito, se observa que los niveles de alanina y serina, muy elevados en STXA2 después de la retirada de arsenito, recuperan sus valores iniciales en las primeras 12 horas (Figura 70). Otros aminoácidos que presentaban niveles elevados en la estirpe STXA2 en ausencia de inductor, como glicina, glutamina, triptófano y treonina, no presentan cambios o incluso aumentan en esas primeras 12 horas, aunque después de 24 o 48 horas recuperan los niveles (Figura 70). Por otro lado, algunos aminoácidos aumentan transitoriamente sus niveles en distintos tiempos. Por ejemplo, la movilización de cianoficina produce un fuerte aumento en los niveles de arginina y en menor medida aspártico. En el primer caso, este aumento es de 20 veces aproximadamente después de 24 horas de la adición de inductor, disminuyendo posteriormente (Figura 70). Por el contrario, el aumento en los niveles de aspártico es mucho menor (1.7 veces),



RESULTADOS

posiblemente debido a una eficiente movilización de este aminoácido en el metabolismo central del carbono. Además, la movilización de aminoácidos procedentes de la degradación de la cianoficina (aspártico y arginina), puede estar relacionada con la acumulación transitoria de otros aminoácidos durante la recuperación de la estirpe STXA2, como prolina y GABA a partir de la arginina, y lisina desde aspártico (Figura 70).

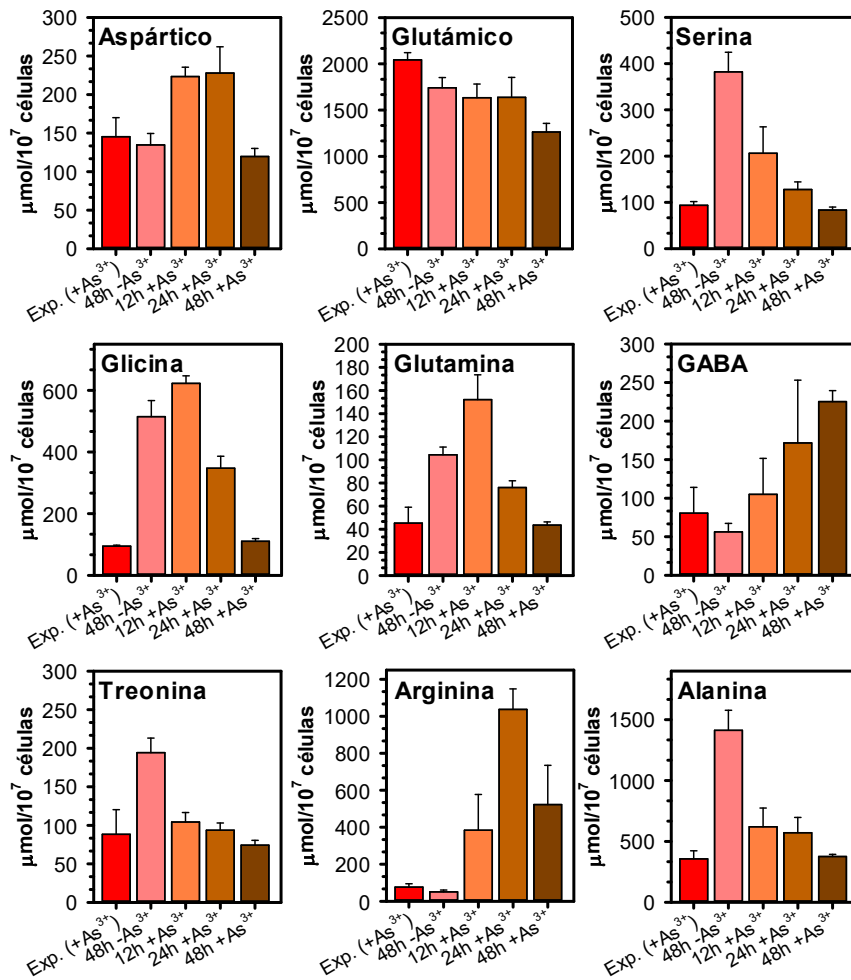


Figura 70. Cuantificación de los aminoácidos en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. Cambio en los niveles de los aminoácidos en respuesta a la adición de 1 mM de arsenito después de 48 horas sin arsenito. La estirpe STXA2 cultivada en presencia de 1 mM de arsenito y en fase exponencial se ha utilizado como referencia (Exp. (+As³⁺)). Los aminoácidos no detectados se indican con un asterisco (*). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.



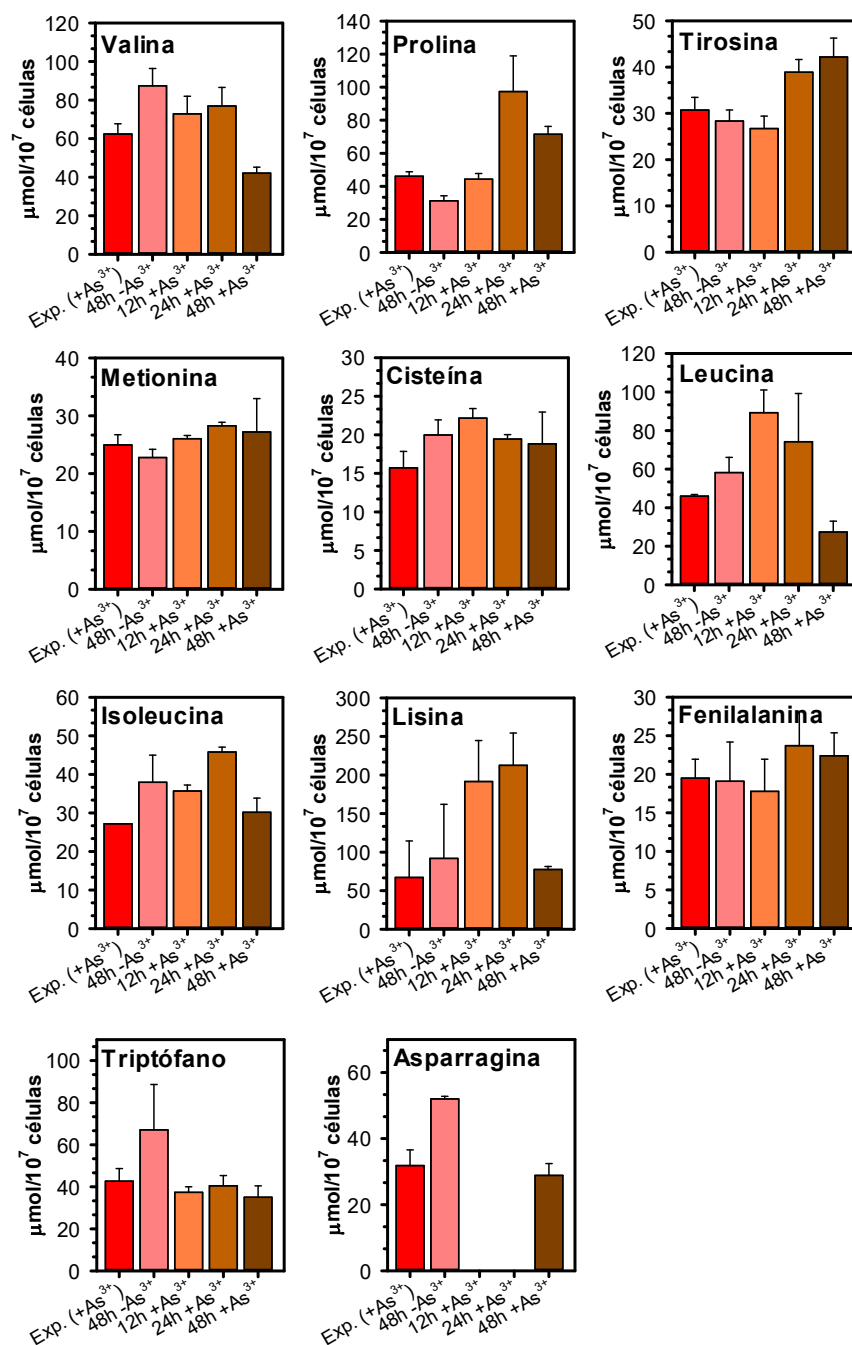


Figura 70 (cont.). Cuantificación de los aminoácidos en la estirpe STXA2 tras la adición del inductor. Cambio en los niveles de los aminoácidos en respuesta a la adición de 1 mM de arsenito después de 48 horas sin arsenito. La estirpe STXA2 cultivada en presencia de 1 mM de arsenito y en fase exponencial se ha utilizado como referencia (Exp. (+As³⁺)). Los aminoácidos no detectados se indican con un asterisco (*). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.



6. Respuesta transcripcional a la disminución en los niveles de TrxA

La mayor parte del conocimiento sobre las tiorredoxinas como reguladores redox deriva de estudios enzimáticos y proteómicos, donde se han determinado muchas de sus proteínas diana. En cambio, se desconoce la respuesta transcripcional global de células con diferentes niveles de tiorredoxina. Por ello, nos planteamos el análisis del efecto que tienen los cambios en los niveles de TrxA sobre la transcripción. Para ello se compararon los perfiles de expresión de las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor, tras la retirada del mismo y tras la posterior adición de nuevo en la estirpe STXA2.

Para dicho estudio, se extrajo ARN total de muestras de células de las estirpes WT y STXA2 en fase exponencial cultivadas en presencia de inductor, y después de 24 y 48 horas sin arsenito de la estirpe STXA2. Tras recoger muestras en el punto 48 horas, se añadió inductor al medio, y se tomaron muestras a las 12 y 24 horas de la nueva adición (punto 60 y 72 horas en la cinética) (ver detalles en el apartado III.2.5.1 y III.2.5.2). A continuación, se llevó a cabo la secuenciación mediante RNA-Seq del transcriptoma (ver detalles en apartado III.2.5.6) y se realizó un análisis comparativo con los datos obtenidos de ambas estirpes en presencia de inductor. Igualmente se compararon los datos referentes a los tiempos 24, 48, 60 y 72 horas con la muestra STXA2 con arsenito (tiempo 0 horas).

6.1 TrxA es esencial para mantener el régimen transcripcional diurno

Los resultados del RNA-Seq se analizaron y representaron mediante diagramas de dispersión donde se puede observar la respuesta global de los cambios en los niveles de expresión (Figura 71). De manera general se observa que hay muchos genes que presentan cambios significativos en sus niveles de expresión (valor p ajustado <0.05) en respuesta a los cambios en los niveles de TrxA. La Figura 71A muestra la comparativa entre los perfiles de expresión de las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). Esta primera comparativa permite observar cambios en 835 genes (Figura 71A, puntos de colores fucsia, verde y azul), 113 genes presentan cambios en su expresión superior a 2 veces ($\log_2 > \pm 1$ y valor p ajustado <0.05). De estos 113 genes, 83 genes se inducen (Figura 71A, puntos de color verde) y 30 genes se reprimen en el mutante STXA2 (Figura 71A, puntos de color azul). Cuando se analizan los resultados obtenidos en la estirpe STXA2 después de 24 y 48 horas sin inductor con respecto al tiempo 0 horas, se observa un aumento en el número de genes cuyos niveles de expresión cambian de manera significativa y al menos 2 veces ($\log_2 > \pm 1$ y valor p ajustado <0.05) (Figuras 71B y 71D). Tras 48 horas sin inductor, observamos que 262 genes se inducen y 278 genes se reprimen. Estos cambios en los niveles de expresión



RESULTADOS

se revierten al añadir el inductor de nuevo (Figura 71D, tiempos 60 y 72 horas). Además, se analizaron los cambios en ncARNs y ARN antisentidos (Archivo S1), y en todos los casos se observa una clara respuesta transcripcional en la estirpe STXA2, reflejada por los distintos niveles de TrxA que presentaba el cultivo.

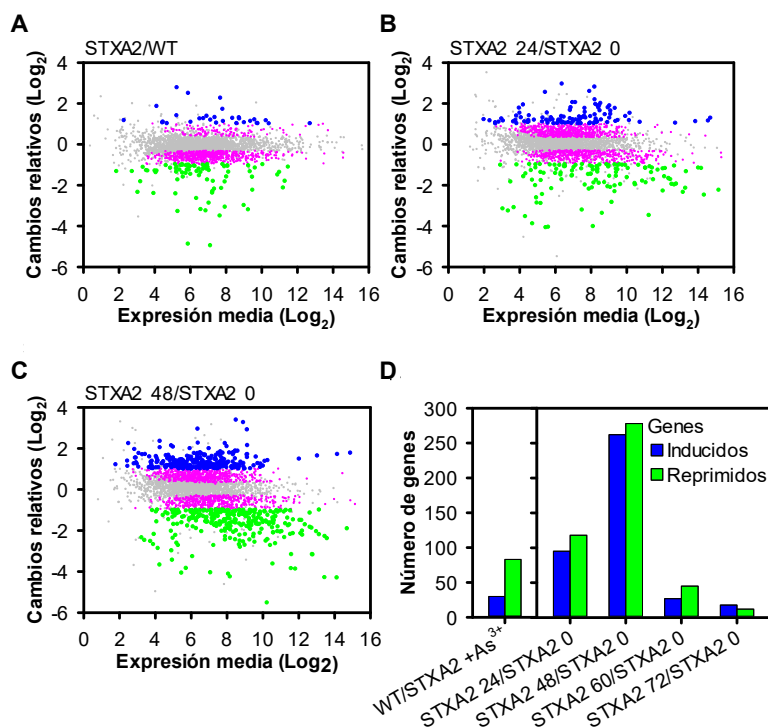


Figura 71. Respuestas globales a cambios en los niveles de TrxA. (A) MA plot. Diagrama de dispersión del cambio en los niveles de expresión (STXA2/WT) con arsenito en \log_2 frente a la expresión media en escala \log_2 . (B) MA plot. Diagrama de dispersión del cambio en los niveles de expresión (STXA2 48 horas sin arsenito/STXA2 con arsenito) en \log_2 frente al promedio de la expresión en escala \log_2 . (C) Diagrama de dispersión del cambio en los niveles de expresión (STXA2 48 horas sin arsenito/STXA2 con arsenito) en \log_2 frente al promedio de la expresión en escala \log_2 . (D) Número de genes con cambios significativos ($\log_2 \geq \pm 1$ y valor p ajustado < 0.05) en los puntos analizados.

Una vez analizada la respuesta global, se procedió a identificar aquellos procesos y rutas afectadas por la respuesta transcripcional cuando hay bajos niveles de TrxA. Para ello se realizaron análisis de ontología génica (análisis GO) para agrupar genes por procesos biológicos, función molecular o componente celular. Para este análisis, se seleccionaron únicamente aquellos genes que presentan un cambio en la expresión superior a 2 veces ($\log_2 \geq 1$ y valor p ajustado < 0.05). La plataforma específica de *Synechocystis* denominada Synergy (synergy.plantgenie.org) permitió obtener los términos GO asociados a cada una de las tres ontologías de genes: función biológica, función molecular y componentes celulares, y con una Tasa de Descubrimientos Falsos (FDR) menor a 0.01. Tras resumir y eliminar términos GO



RESULTADOS

redundantes mediante la plataforma REVIGO (revigo.irb.hr), se representaron con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9.

El análisis de los términos GO asociados a la función biológica (Archivo S2), revela que un grupo de genes están muy reprimidos en la estirpe STXA2 con respecto al WT y en presencia de inductor. Estos genes están implicados en el transporte de hierro a través de sideróforos. Analizando los términos GO de función molecular y componentes celulares se obtienen resultados similares (Archivo S2), términos GO ligados al transporte a través de la membrana y homeostasis de hierro. Por otro lado, los términos GO enriquecidos significativamente que destacan en relación a los genes inducidos en la estirpe STXA2 con respecto al WT en presencia de inductor, son los procesos de regulación transcripcional, los que implican señales moleculares relacionadas con fosforilaciones, y los que implican reacciones de oxidación-reducción así como la transferencia de electrones, todos ellos relacionados con la respuesta de determinados factores transcripcionales cuando tenemos bajos niveles de TrxA (Archivo S2).

La eliminación del inductor del medio de cultivo aumenta claramente el número de genes con una alteración en su expresión (Figura 71), y en el número de términos GO enriquecidos (Archivo S2). El análisis preciso de estos términos nos revela que en las primeras 24 horas, existe un primer grupo de genes que se reprimen y que están asociados con la fotosíntesis y la generación de ATP acoplada a este proceso. Un segundo grupo de genes reprimidos están asociados a procesos como la biosíntesis de clorofila, la fijación de carbono a través de la Rubisco, el transporte de hierro o la biosíntesis de carbohidratos. Pasadas 48 horas en ausencia de inductor, muchos de estos procesos continúan y aparecen otros términos GO debido al aumento en el número de genes reprimidos, como los procesos que constituyen la estructura de los ribosomas, o los procesos relacionados con el clúster hierro-azufre o con el grupo hemo (Archivo S2).

Respecto a los términos GO relacionados con los genes inducidos tras la retirada de arsenito, además de aquellos relacionados con procesos de regulación mediada por factores transcripcionales, aparecen genes relacionados con el ensamblaje del clúster hierro-azufre, con procesos de biosíntesis del cofactor de molibdopterina o con procesos metabólicos relacionados con la síntesis de aldehídos (Archivo S2).

Cuando se añade de nuevo el inductor al medio de cultivo se observa una recuperación en los niveles de los transcritos hasta alcanzar valores similares a los del inicio del experimento, que implica además que no se observen términos GO con un FDR muy significativo (Archivo S2).



6.1.1. Transporte de electrones

El análisis transcriptómico revela que la mayoría de los genes relacionados con el complejo de los PBS, el principal sistema de captación de luz, muestran una fuerte disminución en sus niveles de expresión. Entre los genes que presentan una disminución mayor se encuentran los que forman parte del operón *cpcABC1C2*, también *apcA*, *apcB*, *apcC* o *cpcD* (Figura 72). Otros genes como el gen *cpcF*, que codifica una ficocianobilina liasa, no presenta diferencias significativas. Los genes *nblA1* y *nblA2*, relacionados con la degradación de los ficobilisomas y que se inducen en limitación de nitrógeno o azufre (Forchhammer y Schwarz, 2019; Richaud et al., 2001), presentan un aumento significativo.

Por otro lado, todos los genes que codifican proteínas del PSI, excepto el gen *psaM*, disminuyen en niveles similares tras la retirada del inductor del medio de cultivo (Figura 72). En el caso del PSII, la mayoría de los genes presentan una disminución en su expresión, aunque en diferentes niveles. Curiosamente, los genes *psbA1*, *psbA2* y *psbA3* no presentan variaciones significativas, a pesar de observar una fuerte disminución en los niveles de la proteína D1 mediante Western blot (Figura 36). Otros genes que tampoco presentan diferencias significativas son *psbN*, *psbY* y *psb27*. Una excepción es el gen *psb28-2*, que codifica una proteína que participa en el ensamblaje del PSII, y que sí presenta un aumento significativo en sus niveles de expresión.

Por otro lado, los genes *hliA* y *hliB* presentan un aumento en los niveles de expresión después de 24 horas en ausencia de inductor, mientras que el gen *hliC* aumenta tras 48 horas en estas condiciones (Figura 72). Estos genes codifican las proteínas HliA, HliB y HliC, que junto a HliD, se inducen en alta intensidad lumínica y presentan una función fotoprotectora del PSII a través de la formación de heterodímeros.

Los genes que codifican las subunidades del complejo Cit *b6f* se comportan de manera similar a los genes del PSII y del PSI, disminuyendo sus niveles de expresión todos los genes excepto *petC2* y *petC3*. Estos dos últimos genes codifican proteínas alternativas a PetC1, que es la principal proteína Rieske del complejo (Schneider et al., 2004).

Los grupos de genes que se han comentado anteriormente están directamente asociados al LET y la síntesis de ATP. Cuando se analiza la respuesta de los genes relacionados con el transporte alternativo de electrones como el CET o la vía respiratoria se observa que no presentan grandes cambios a excepción del gen *ndhD2*, que codifica una proteína del complejo NDH-1L', y que aumenta fuertemente sus niveles de expresión en ausencia de inductor (Figura 72). Otros genes que aumentan los niveles de expresión, aunque en menor medida, son dos genes que codifican quinonas



RESULTADOS

oxidoreductasas tipo NDH-2 (*ndbA* y *ndbB*) y dos genes del complejo citocromo BD Quinol oxidasa (CYD), *cydA* y *cydB* (Figura 72). La respuesta en la estirpe STXA2 respecto a las proteínas tipo NDH-2 y el complejo CYD parece estar relacionada con la limitación observada en el LET. Ambos sistemas están presentes en las membranas tilacoidales, además de la membrana plasmática, contribuyendo a mantener una alta capacidad de oxidación de la PQ y del PSI en condiciones limitantes (Lea-Smith et al., 2016).

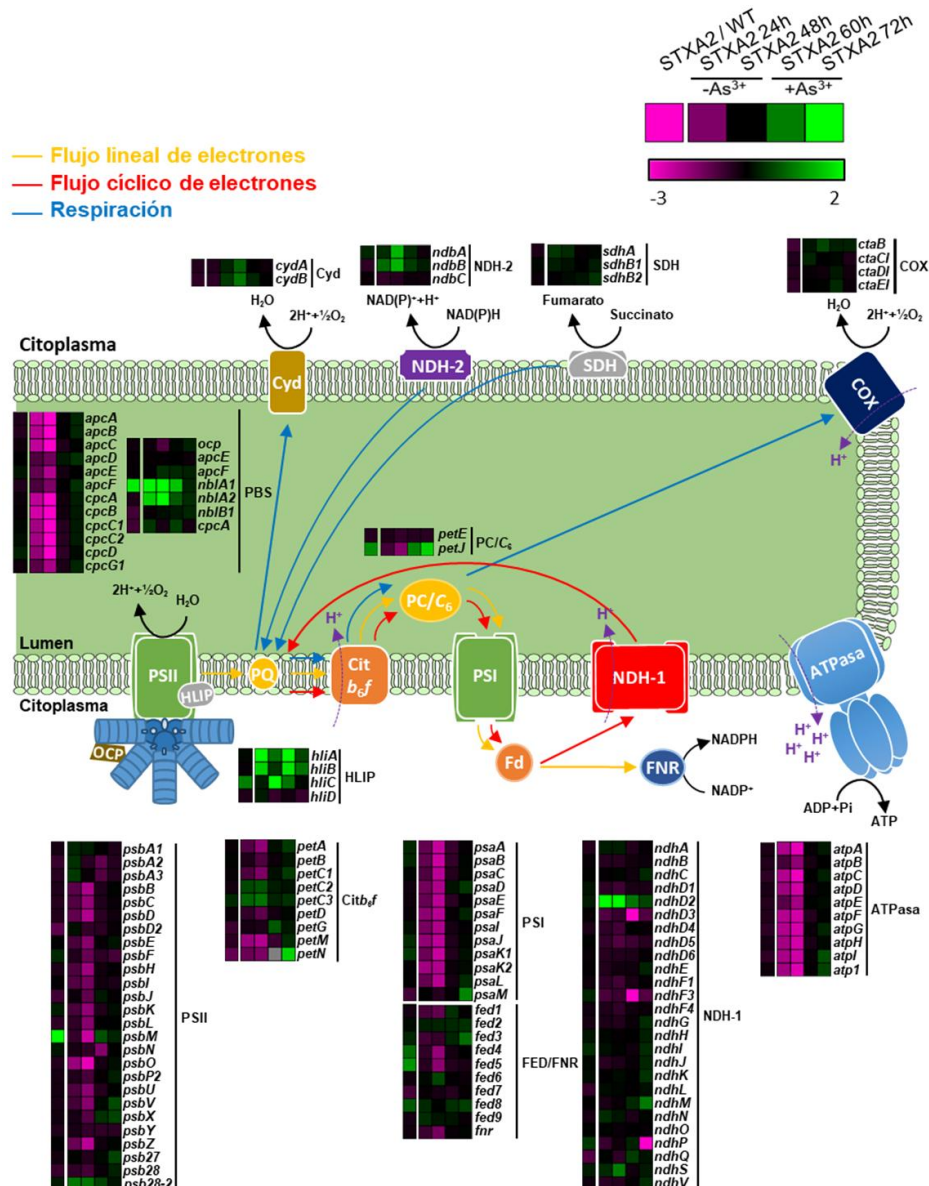


Figura 72. Cambios en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo energético de *Synechocystis*. Todos los genes indicados codifican componentes del aparato fotosintético, del aparato respiratorio y de la síntesis de ATP. La descripción de la proteína



codificada por cada gen se indica en la Tabla S1 del RNA-Seq. La primera columna corresponde a la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). El resto de columnas corresponden con la cinética realizada en la estirpe STXA2 y los cambios en la expresión de los genes se han establecido a partir de la comparativa con el tiempo 0 horas (STXA2 +As³⁺). Para la expresión de los genes se ha utilizado un mapa de calor o *heatmap* en base al log₂, generado con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia (log₂ = -3) hasta verde (log₂ = 2).

6.1.2. Metabolismo del carbono

El ATP y NADPH generado durante el transporte de electrones en el proceso fotosintético se utiliza posteriormente y en su mayoría por el ciclo de CBB. Cuando se analizan los genes que codifican las enzimas de este ciclo en las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor, sólo se observa un aumento significativo en los genes que codifican la enzima Rubisco y la chaperona RbcX, que forman el operon *rbcLXS* (*rbcL*, log₂ = 0.86; *rbcX*, log₂ = 1.00 y *rbcS*, log₂ = 0.92), y una disminución en los niveles de expresión de la enzima ribosa 5-P Isomerasa (*rpiA*, log₂ = -1.06) (Figura 73).

Por otro lado, algunos genes del operón *ccmK2K1LMN*, que codifican proteínas que forman parte del carboxisoma, presentan niveles de expresión superiores en la estirpe STXA2 respecto al WT (*ccmL*, log₂ = 0.72; *ccmM*, log₂ = 1.06 y *ccmN*, log₂ = 1.29) (Figura 73). La proteína CcmM desempeña un papel importante en el ensamblaje inicial del carboxisoma, en la incorporación de la Rubisco y, junto a la proteína CcmN, se encarga de conectar la Rubisco con la anhidrasa carbónica y la envuelta del carboxisoma. Finalmente, *ccmL* es una proteína estructural de la envuelta del carboxisoma (Kerfeld y Melnicki, 2016).

La retirada del inductor produce una disminución progresiva de los niveles de expresión de todos los genes relacionados con la fijación de carbono excepto los genes que codifican para las enzimas ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa (*rpe*), ribosa 5-P isomerasa B (*rpiB*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gap1*) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (*fbp*), que no muestran cambios significativos. En la estirpe STXA2 y después de las primeras 24 horas sin inductor, los genes del operón *rbcLXS* presentan una disminución mayor en los niveles de expresión (*rbcL*, log₂ = -1.59; *rbcX*, log₂ = -1.69 y *rbcS*, log₂ = -1.99) con respecto al resto de genes (Figura 73). Por otro lado, la mayoría de los genes que codifican componentes del carboxisoma presentan una disminución en los niveles de expresión. En todos los casos, excepto el gen que codifica la enzima GAP deshidrogenasa (*gap1*), la retirada del inductor lleva a una disminución en los niveles de expresión de genes que se han descrito como regulados por los ciclos luz-oscuridad y que su expresión disminuye en oscuridad (Saha et al., 2016). Además, el gen *fbpII* (*slr0952*), que codifica la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa y que se induce en los periodos de oscuridad (Saha et al., 2016), aumenta sus niveles de expresión.



RESULTADOS

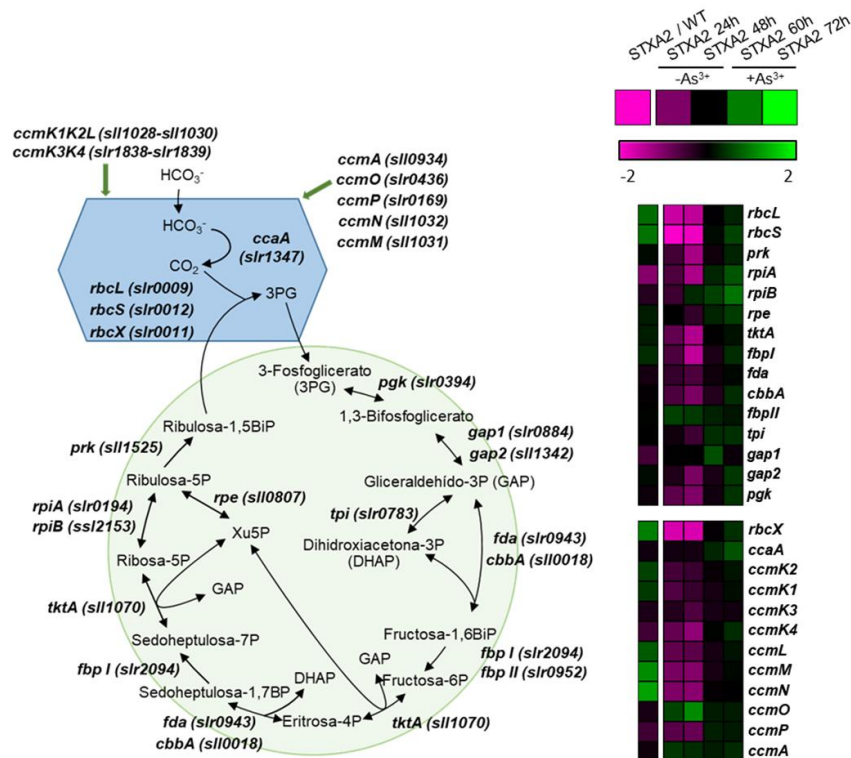


Figura 73. Cambios en la expresión de los genes relacionados con el ciclo de CBB y el carboxisoma en *Synechocystis*. Todos los genes indicados codifican las enzimas del ciclo de CBB y los componentes del carboxisoma. La descripción de la proteína codificada por cada gen se indica en el Archivo S1 del RNA-Seq. La primera columna corresponde a la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). El resto de columnas corresponden con la cinética realizada en la estirpe STXA2 y los cambios en la expresión de los genes se han establecido a partir de la comparativa con el tiempo 0 horas (STXA2 +As³⁺). Para la representación de los cambios en la expresión de los genes se ha utilizado un mapa de calor o *heatmap* en base al log₂, generado con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia (log₂ = -2) hasta verde (log₂ = 2).

Cuando se analiza el perfil de expresión de los genes de las enzimas del metabolismo glucolítico no se observan diferencias significativas en la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor. Sin embargo, la retirada de este del medio produce cambios significativos (tiempo 48 horas, $-0.98 < \log_2 < -1.32$) en los niveles de expresión de los genes que codifican enzimas como la fructosa bisfosfato aldolasa (*cbbA*), fosfoglucomutasa (*pgm/slr0726*), fosfofructoquinasa (*pfkA/slr1196*), fosfoglicerato quinasa (*pgk*), enolasa (*eno*), fosfoglicerato mutasa (*gpm*) y fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*) (Archivo S1).

La retirada del inductor del medio de cultivo produce una parada en el crecimiento y un aumento en los niveles de glucógeno en condiciones estándar de crecimiento en STXA2. El análisis de los niveles de expresión de los genes relacionados con la síntesis de glucógeno revela una disminución en los niveles de expresión del gen



que codifica para la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (*glgC*, $\log_2 = -1.47$), y en menor medida en una de las dos isoformas de glucógeno sintasa (*glgA1*, $\log_2 = -0.73$) y en el gen que codifica una de las isoamilasas (*glgX/slr1857* $\log_2 = -0.99$) (Archivo S1). Los genes *glgC*, *glgA1* y *glgX* se han descrito como genes cuyos niveles de expresión están regulados por los ciclos luz-oscuridad, inducidos en luz y reprimidos en oscuridad, aunque en menor medida con respecto a los genes relacionados con la fotosíntesis (Saha et al., 2016). En nuestro caso, la retirada de arsenito produce una represión en estos genes a pesar del aumento del glucógeno en estas células.

Con respecto a la ruta de las pentosas fosfato (ciclo OPP), solo observamos diferencias en los genes *rpiA* ($\log_2 = -1.36$) y *tktA* ($\log_2 = -1.39$) (Archivo S1). Esta ruta está estrechamente relacionada con el ciclo de CBB en luz y realiza un papel importante en el catabolismo del glucógeno en oscuridad y en condiciones mixotróficas o heterotróficas. Estos genes no se inducen en luz y se reprimen en oscuridad en las cianobacterias, salvo los genes que codifican enzimas que participan en el ciclo de CBB (Saha et al., 2016). Con respecto a los genes implicados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ningún gen muestra cambios significativos en los niveles de expresión.

6.1.3. Replicación, transcripción y traducción

La estirpe STXA2 cuando se cultiva en presencia de inductor presenta niveles de expresión de los genes, relacionados con la replicación del ADN, similares a la estirpe WT. Solo existen pequeñas diferencias en algunos genes que se reprimen como el gen que codifica la subunidad beta de la ADN polimerasa III (*dnaN*, $\log_2 = -0.87$), o genes que se inducen como el gen que codifica la helicasa RecQ (*recQ*, $\log_2 = 0.88$) (Archivo S1). La retirada del arsenito del medio tampoco genera cambios importantes en la estirpe STXA2, salvo la represión del gen que codifica una subunidad de la helicasa RuvAB (unión de Holliday) (*ruvA*, $\log_2 = -1.24$), y la inducción de los genes que codifican la helicasa replicativa (*dnaB*, $\log_2 = 0.83$) y la subunidad alfa de la ADN polimerasa III (*dnaE*, $\log_2 = 0.86$).

En relación a los genes relacionados con la transcripción, las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor no muestran grandes diferencias significativas. Sólo se observan diferencias relevantes en los genes que codifican los factores sigma B (*sigB*, $\log_2 = -0.99$) y sigma D (*sigD*, $\log_2 = -0.81$) (Archivo S1). Tras retirar el inductor, tres factores sigma del grupo 2 presentan un aumento significativo en los niveles de expresión tras 48 horas (*sigB*, $\log_2 = 1.02$; *sigC*, $\log_2 = 1.30$; *sigH*, $\log_2 = 1.18$). Estos factores no son esenciales, aunque parecen jugar un papel importante en diferentes condiciones de estrés, como por ejemplo el estrés oxidativo (Hakkila et al., 2019).



Respecto a la traducción de proteínas, un proceso especialmente afectado en la estirpe STXA2 después de la retirada del inductor, no se observan diferencias significativas entre las estirpes WT y STXA2 con arsenito con respecto a los genes implicados en este proceso (Archivo S1). La retirada de arsenito produce una disminución de entre 2 y 2.5 veces después de 48 horas (\log_2 entre -1 y -1.33) en 15 de los 63 genes relacionados con este proceso.

6.2 Sistemas de regulación *redox* y estrés oxidativo

La identificación de proteínas diana comunes de TrxA con otras TRX o GRX, podrían implicar una regulación en la expresión génica de estos sistemas. Además, la relación entre TrxA y procesos relacionados con el estrés oxidativo, también podrían indicar una regulación de la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. El análisis de los datos de transcriptómica entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor, no muestra diferencias significativas en los niveles de expresión de otras TRX (Figura 74), consistente con lo observado en los análisis de Western blot (Figura 16). Respecto a los genes de la FTR (*ptrC* y *ptrV*), observamos pequeñas diferencias en el gen *ptrV* ($\log_2 = -0.87$). Tampoco se observan diferencias significativas en los genes relacionados con el metabolismo del glutatión, las GRX, ni en los genes que codifican las PRX, SOD o catalasa (Figura 74).

Al eliminar el inductor del medio se observan cambios en algunos genes que codifican para PRX u otras proteínas relacionadas con el estrés oxidativo. De esta forma, el análisis de los cambios después de 48 horas sin arsenito revela un aumento en el nivel de expresión del gen que codifica para TrxQ (*trxQ*, $\log_2 = 1.00$), mientras que no se observan cambios significativos en la expresión de los genes *trxB* y *trxC*, que codifican la TrxB y la TrxC respectivamente (Figura 74). Respecto a las GRX, los genes *grxA* y *grxC* también aumentan su expresión después de 48 horas (*grxA*, $\log_2 = 1.18$ y *grxC*, $\log_2 = 0.80$). Dentro del grupo de las PRX, los niveles de expresión del gen *2-cys prx* aumentan ($\log_2 = 1.06$), y en menor medida también los del gen *prxQ2* ($\log_2 = 0.70$). Sin embargo, los genes que codifican las dos PRX más abundantes en *Synechocystis* (Simon et al., 2002), PrxII y 1-Cys Prx, disminuyen sus niveles de expresión (*prxII*, $\log_2 = -1.04$ y *1-cys prx*, $\log_2 = -0.68$), así como el gen que codifica la catalasa (*katG*, $\log_2 = -1.34$). A diferencia de esto, el nivel de expresión de un gen correspondiente a una peroxidasa homóloga a las enzimas glutatión peroxidasa aumenta (*gpx1/slr1171*, $\log_2 = 1.10$). Los resultados obtenidos están relacionados con los niveles de ROS cuantificados en la estirpe STXA2, que no presentan un aumento de estos niveles al eliminar el inductor del medio (Figura 44). Como hemos comentado anteriormente, esta situación



se debe a la disminución del transporte lineal de electrones, principal responsable de la generación de ROS.

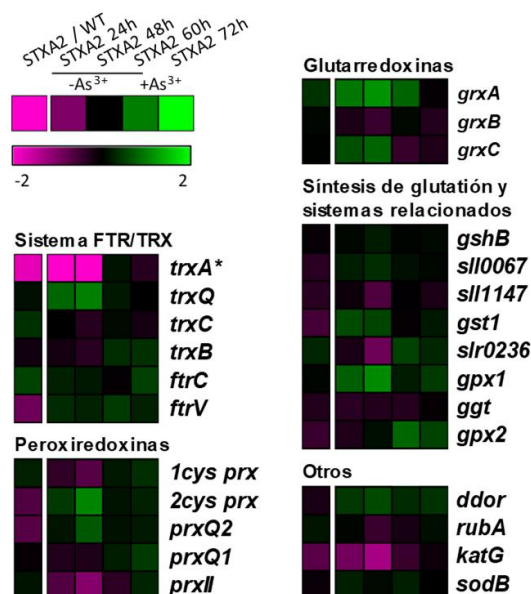


Figura 74. Cambios en la expresión de los genes relacionados con los sistemas redox en la estirpe STXA2. Todos los genes indicados codifican proteínas identificadas con función redox en *Synechocystis*. La descripción de la proteína codificada por cada gen se indica en el Archivo S1 del RNA-Seq. La primera columna corresponde a la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). El resto de columnas corresponden con la cinética realizada en la estirpe STXA2 y los cambios en la expresión de los genes se han establecido a partir de la comparativa con el tiempo 0 horas (STXA2 +As³⁺). Para la expresión de los genes se ha utilizado un mapa de calor o *heatmap* en base al log₂, generado con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia (log₂ = -2) hasta verde (log₂ = 2).

6.3 Factores transcripcionales y sistema de dos componentes

6.3.1. Análisis de la regulación transcripcional de FurA en la estirpe STXA2

La comparativa entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor permite detectar diferencias en los patrones de expresión de genes relacionados con el transporte de hierro, estas diferencias en algunos casos se mantienen o se incrementan tras la retirada del inductor (Figura 75).

En la mayoría de especies bacterianas, los genes implicados en el transporte, eliminación, almacenamiento y metabolismo del hierro están regulados por FurA en respuesta a la disponibilidad de hierro (Andrews et al., 2003). Diferentes estudios transcriptómicos llevados a cabo en condiciones limitantes de hierro permitió la identificación de una serie de genes que se inducen en estas condiciones (Georg et al., 2017; Hernández-Prieto et al., 2012), muchos de estos genes se han determinado como posibles dianas de FurA. Este factor transcripcional es una metaloproteína



homodimérica que une Fe^{2+} y actúa principalmente como represor transcripcional (Escolar y Pe, 1999). Cuando no hay hierro disponible, FurA se separa del ADN y permite la transcripción de los genes diana. Los genes del regulón de FurA están muy estudiados en *Anabaena* (González et al., 2018).

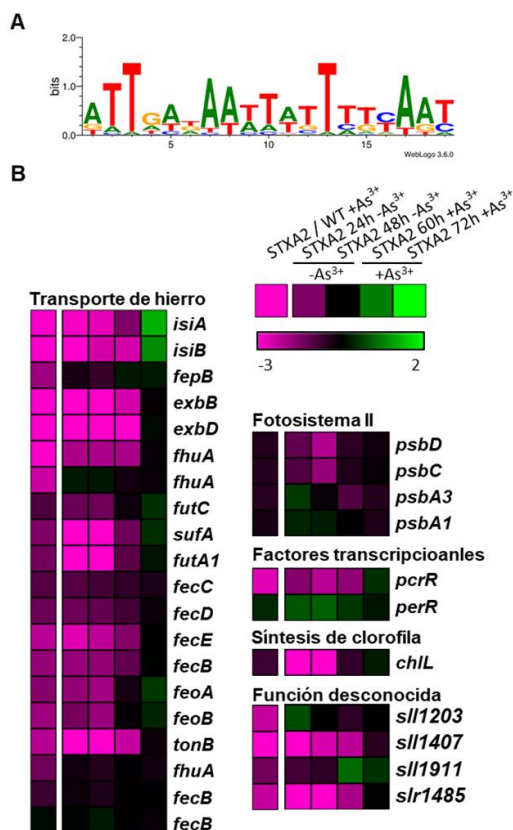


Figura 75. Cambios en la expresión de los genes del regulón de FurA en la estirpe STXA2. (A) Regulón de FurA identificado mediante la base de datos RegPrecise y representado mediante Weblogo 3.6.0. **(B)** Genes del regulón de FurA según el proceso en el que participan las proteínas codificadas. La descripción de la proteína codificada por cada gen se indica en el Archivo S1 del RNA-Seq. La primera columna corresponde a la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). El resto de columnas corresponden con la cinética realizada en la estirpe STXA2 y los cambios en la expresión de los genes se han establecido a partir de la comparativa con el tiempo 0 horas (STXA2 +As³⁺). Para la representación de los cambios en la expresión de los genes se ha utilizado un mapa de calor o *heatmap* en base al log₂, generado con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia (log₂ = -3) hasta verde (log₂ = 2).

Las cianobacterias presentan una serie de adaptaciones fisiológicas a cambios en las concentraciones de hierro presentes en la naturaleza (Kaushik et al., 2018). En la membrana externa de *Synechocystis*, se produce la adsorción de hierro mediante porinas no específicas y un sistema de cuatro transportadores tipo FhuA, que son dependientes del sistema TonB-ExbB-ExbD. En el espacio periplásmico, las proteínas como FutA2 unen hierro en forma Fe^{3+} y mantienen un *pool* de hierro disponible para



RESULTADOS

las células. Este hierro se transporta a través de la membrana plasmática por los complejos FutABC y FecCDE, y permeasas cFTR1 y CDF. En la membrana plasmática también hay otro transportador denominado FeoB y su activador FeoA. Además, el hierro unido a sideróforos en el exterior se transporta a través de una proteína específica denominada FecB que posteriormente lo conduce al complejo transportador denominado FecCDE. FurA parece regular la mayoría de estos genes, siendo el principal regulador del transporte y utilización de hierro (Kaushik et al., 2018).

Se analizó el regulón de FurA en *Synechocystis* mediante la base de datos RegPrecise (regprecise.lbl.gov), donde se reconstruyen por enfoque genómico comparativo, regulones de factores transcripcionales bacterianos. De esta forma, se han identificado 24 motivos de unión para FurA que pueden regular 31 genes en 18 operones. Utilizando la herramienta Weblogo 3.6.0 se observa que existe un motivo palindrómico de 19 nucleótidos, con alto predominio de timina en posiciones 3 y 13, y una prevalencia intermedia de timina en posiciones 2 y 10 y de adenina en posiciones 7, 8 y 17 (Figura 75A). En la mayoría de las posiciones restantes también predominan timina y adenina, aunque en menor medida. El análisis de la respuesta transcriptómica de la estirpe STXA2 en presencia de inductor con respecto al WT, muestra que la mayoría de los genes que se encuentran muy reprimidos en STXA2 son potencialmente dianas de FurA (Figura 75B). La mayoría de estos genes han sido comprobados experimentalmente como dianas de FurA en *Anabaena* (González et al., 2010, 2014, 2016). Todos los genes identificados en el regulón están reprimidos en la estirpe STXA2 en presencia de inductor excepto dos genes que codifican para FecB (*slr1491* y *slr1492*).

Otros genes que se reprimen de manera significativa y que se identifican en el regulón de FurA son marcadores característicos de la respuesta a la limitación a hierro, tales como *isiA* (*slI0247*) y *isiB* (*slI0248*), el gen *pcrR* (*slI1408*) que codifica un regulador de la síntesis de sideróforos y genes sin función conocida (*slI1203*, *slI1407*, *slr1485* y *slI1911*). Por otra parte, hay genes no identificados como parte del regulón de FurA pero que se encuentran en el contexto génico de genes identificados en el regulón y que se reprimen en STXA2, tales como *slI0249*, *slr0514*, *slr0516*, *slr1488*, *slr1489*, *slI0478* y *slI0477*. Por el contrario, algunos genes del PSII como el gen *psbA1* (*slr1181*), *psbA3* (*slI1867*), *psbC* (*slI0851*) y *psbD* (*slI0849*), o el regulador de estrés oxidativo *perR* (*slr1738*), no presentan cambios a pesar de haber sido identificados como posibles dianas de FurA (Figura 75B). Es posible que estos genes estén sometidos a una regulación más fuerte mediada por otro factor transcripcional.

En resumen, los niveles del 10% de TrxA en la estirpe STXA2 con respecto al WT permite observar grandes diferencias significativas en los genes relacionados con el regulón de FurA pero no en otros genes que también responden a los cambios en la



RESULTADOS

disponibilidad de hierro (Archivo S1). Aunque no podemos descartar una respuesta producida por una acumulación de hierro en el interior celular, la situación observada parece estar provocada por una regulación directa o indirecta sobre FurA debido a los bajos niveles de TrxA. Curiosamente, el análisis de los niveles del transcrito del gen *furA* (*sll0567*) pone de manifiesto que no hay cambios de expresión de este gen entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor. A pesar de esto, como se muestra en la Figura 76A, el análisis mediante Western blot de FurA revela que los niveles son superiores ($141.03 \pm 11.02\%$) en la estirpe STXA2 con respecto al WT. De esta forma, las diferencias en los niveles de FurA podrían explicar una mayor actividad de represión observada en el regulón.

La retirada del inductor del medio produce una mayor represión en los niveles de expresión de la mayoría los genes comentados anteriormente. Además, en estas condiciones se observa un aumento en los niveles de expresión de *furA* después de 48h ($\log_2 = 1.65$) (Figura 75B). Los niveles de proteína no presentan diferencias significativas respecto al tiempo 0 horas, reforzando la relación directa entre los niveles de TrxA y el estado de FurA (Figura 76A).

En *Anabaena* se han llevado a cabo estudios que muestran una respuesta de FurA a cambios en las condiciones *redox* intracelulares, estableciendo una posible relación entre FurA y el transporte de electrones fotosintético. FurA en *Anabaena* tiene cinco cisteínas en su secuencia de aminoácidos, mientras que la proteína homóloga en *Synechocystis* presenta 6. Los estudios realizados utilizando mutantes puntuales en *Anabaena* indicaron un posible “*switch redox*” entre cisteínas, unas que unen Fe^{2+} y otras que forman un puente disulfuro (Botello-Morte et al., 2014, 2016). El estudio de Botello-Morte y colaboradores muestra un motivo $C^{101}-C^{104}$ con actividad disulfuro reductasa similar a GRX o PRX, proponiendo una función *redox* sensora de FurA. Los experimentos *in vivo* indicaron en *Anabaena* que FurA se encuentra en forma monomérica y con una, tres o cinco cisteínas libres, siendo sensible a H_2O_2 (Botello-Morte et al., 2016). Sin embargo, los experimentos de *Cross-linking* con TRX y GRX indicaron que FurA no es una proteína diana (Botello-Morte et al., 2014), acorde a los resultados obtenidos en estudios de interacción con TrxA, TrxB o GrxA monocisteínicas en *Synechocystis*. Debido a esto, se analizó el estado *redox in vivo* de FurA en las estirpes WT y STXA2 siguiendo el mismo procedimiento que para las TRX. En presencia de AMS, todas las muestras presentan una banda que corresponde a la proteína totalmente reducida (Figura 76B), como podemos comprobar en las muestras que contienen DTT. Además, es posible observar bandas que pueden corresponder a distintas conformaciones de FurA debido a que también están presentes en la muestra control sin AMS. A pesar de que la estirpe STXA2 después de 48 horas sin arsenito



RESULTADOS

presenta una banda con mayor intensidad que podría corresponder a una forma oxidada, la adición de DTT antes del agente alquilante permite observar otra banda con diferente movilidad electroforética y que dificulta la interpretación de los resultados (Figura 76B).

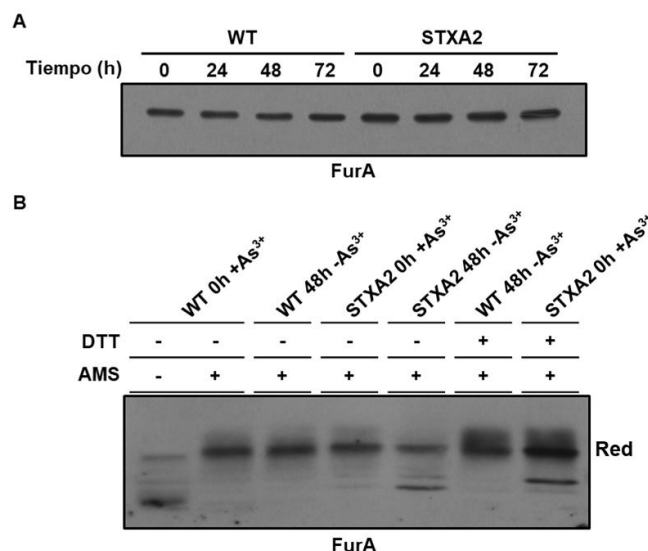


Figura 76. Análisis mediante Western blot de los niveles y del estado redox in vivo de FurA en las estirpes WT y STXA2. (A) Niveles de FurA en la estirpe STXA2 en presencia y ausencia de arsenito. Los extractos celulares totales correspondientes a 10⁷ células de STXA2 y del WT se extrajeron y sometieron a una electroforesis en SDS-PAGE. El tiempo 0 horas corresponde a extractos celulares de las estirpes WT y STXA2 en presencia de 1 mM de arsenito, mientras que el resto de tiempos indicados corresponden a extractos celulares tras la retirada del arsenito. **(B)** Análisis mediante Western blot del estado redox de FurA. El procedimiento realizado es el mismo que en la Figura 40A. El anticuerpo utilizado es anti-FurA en A y en B.

Synechocystis presenta otros dos factores transcripcionales de la familia de Fur que no son esenciales. Por un lado, se encuentra Zur (*slr1937*), factor transcripcional que regula el transporte de zinc (Zn²⁺). Recientemente ha sido identificado como un factor transcripcional que presenta regulación redox frente a cambios luz-oscuridad en *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ansong et al., 2014). Este factor presenta en *Synechocystis* y *Synechococcus* sp. PCC 7002 cinco cisteínas conservadas. Zur es un sensor de los niveles de zinc, cuando se une a Zn²⁺ actúa como represor del operón *znuABC* (*slr2043-slr2044-slr2045*), el gen *slr1550* que codifica una porina posiblemente regulada por zinc y su propio gen (Barnett et al., 2012). Los genes del operón *znuABC* corresponden a una proteína periplásmica de unión a Zn²⁺ (ZnuA), una permeasa (ZnuB) y un componente ATPasa (ZnuC) (Thelwell et al., 1998). Zur podría necesitar condiciones reductoras para unir Zn²⁺ y reprimir el operón *znuABC* (Ansong et al., 2014).

Cuando se analizan los cambios transcripcionales en la estirpe STXA2, no se observa cambios significativos en la expresión del gen *zur*. Respecto al operón *znuABC*,



RESULTADOS

sólo el gen *znuA* presenta un aumento significativo en los niveles de expresión después de 48 horas sin inductor ($\log_2 = 0.86$) (Archivo S1). Estos datos no parecen indicar una relación con TrxA y quizás una posible regulación *redox* de Zur, a diferencia de FurA. Curiosamente, se observa un aumento en los niveles de expresión de los genes *ziaR* y *ziaA* (*sll0792* y *slr0798* respectivamente), donde ZiaR es una proteína represora específica de zinc y ZiaA es un transportador de membrana específico de zinc (Barnett et al., 2012). Estos genes se inducen en la estirpe STXA2 después de la retirada del inductor hasta alcanzar unas diferencias significativas en el tiempo 48 horas (*ziaR*, $\log_2 = 1.75$ y *ziaA*, $\log_2 = 1.18$).

La herramienta RegPrecise predice también sitios de reconocimiento de Zur aguas arriba del gen *sll1550*, que codifica una posible porina regulada por zinc (Barnett et al., 2012). Este gen está fuertemente reprimido en la estirpe STXA2 con respecto al WT en presencia de inductor ($\log_2 = -2.39$). La retirada del inductor permite observar como los niveles de expresión de este gen disminuyen *sll1550* ($\log_2 = -0.96$) y se recuperan tras la adición de inductor. Estos datos sugieren la existencia de diferencias en la homeostasis de zinc en STXA2 con respecto a la estirpe WT, es necesario estudiar a fondo la respuesta de Zur para confirmar una dependencia *redox* de este, así como posibles interactores.

6.3.2. Análisis de la regulación transcripcional de PedR en la estirpe STXA2

Uno de los reguladores identificado como regulador transcripcional sensible a la actividad fotosintética, previamente identificado como interactores de TrxA y TrxB, es el codificado por el gen *pedR* (*ssl0564*) (Horiuchi et al., 2010). La mutación de este regulador provoca cambios en una serie de genes que se han descrito como dianas del mismo (Nakamura y Hihara, 2006). En condiciones de baja intensidad lumínica, PedR está principalmente oxidado y activa la expresión de los genes *chIL*, *chIN* y *chIB* que codifican la protoclorofilida reductasa independiente de luz y un gen de función desconocida (*slr1957*). Además, reprime el gen *ndhD2* que codifica una subunidad del complejo NDH-1, el gen *rpe* que codifica la enzima pentosa-5-fosfato-3-epimerasa, y el operón *pedR-sll0296*. Un aumento en la intensidad lumínica produce la reducción e inactivación de PedR, que conlleva cambios en los niveles de expresión de sus genes diana. En definitiva, existe una relación entre las TRX y PedR que permite la inducción o represión transitoria de genes diana como una respuesta a cambios en la intensidad lumínica (Horiuchi et al., 2010).



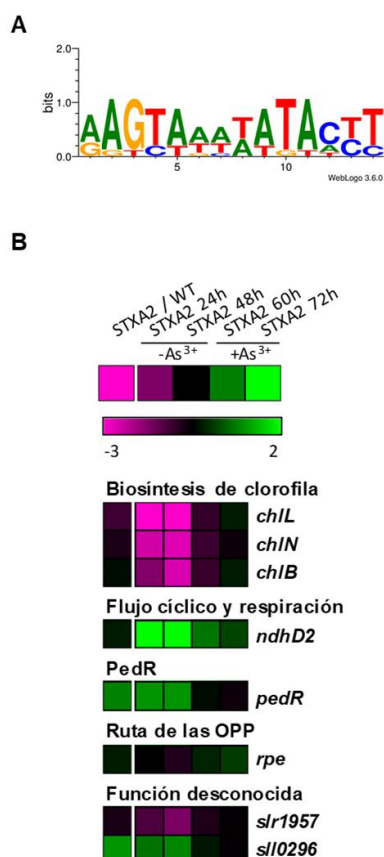


Figura 77. Cambios en la expresión de los genes del regulón de PedR en la estirpe STXA2. (A) Regulón de PedR identificado mediante la base de datos RegPrecise y representado mediante Weblogo 3.6.0. (B) Genes del regulón de PedR según el proceso en el que participan las proteínas codificadas. La descripción de la proteína codificada por cada gen se indica en Archivo S1 del RNA-Seq. La primera columna corresponde a la comparativa entre las estirpes STXA2 y WT en presencia de inductor (STXA2/WT). El resto de columnas corresponden con la cinética realizada en la estirpe STXA2 y los cambios en la expresión de los genes se han establecido a partir de la comparativa con el tiempo 0 horas (STXA2 +As³⁺). Para la representación de los cambios en la expresión de los genes se ha utilizado un mapa de calor o *heatmap* en base al log₂, generado con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia (log₂ = -3) hasta verde (log₂ = -2).

En la base de datos RegPrecise (regprecise.lbl.gov), se identifican 9 motivos de unión que pueden regular 8 genes en 7 operones. Utilizando la herramienta Weblogo 3.6.0, observamos un motivo palindrómico de 14 nucleótidos, con predominios intermedios de adenina en posiciones 2 y 11, de timina en posición 10 y de guanina en posición 3 (Figura 77A).

El análisis transcriptómico permite determinar que el operón *pedR-sII0296* se encuentra inducido en la estirpe STXA2 cuando está en presencia de inductor con respecto al WT (Figura 77B). En cambio, el resto de genes diana de este factor no presentan cambios significativos tal y como se han definido inicialmente (log₂ >±1 y valor



p ajustado <0.05). Tras 24 horas sin inductor, todos los genes excepto el gen *rpe* presentan diferencias significativas, que aumentan después de 48 horas sin inductor. En concreto, los genes *chlL*, *chlN*, *chlB* y *slr1957* se reprimen, mientras que los genes *ndhD2*, *slI0296* y *pedR* se inducen (Figura 77B). La adición de inductor y la recuperación de los niveles de TrxA lleva a que los genes presenten unos niveles de expresión similares los niveles del WT. Estos cambios observados en el regulón de PedR, coinciden con la respuesta transcriptómica de un mutante PedR (Nakamura y Hihara, 2006).

6.3.3. Análisis de factores transcripcionales de tipo OmpR en la estirpe STXA2

Se han descrito algunos factores transcripcionales de la familia OmpR de reguladores de respuesta como posibles proteínas diana de TrxA. La identificación de estos factores se ha realizado mediante ensayos de interacción entre una TrxA con una cisteína del sitio activo sustituida por serina (TrxA_{C35S}) y estos factores transcripcionales, además de ensayos *in vitro* utilizando las proteínas purificadas (Kadowaki et al., 2015). Entre los reguladores identificados se encuentran RpaA, RpaB y ManR. RpaA y RpaB son dos reguladores de respuesta implicados en procesos como la aclimatación a la luz, la respuesta a estrés o el metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias mientras que ManR regula el transporte de manganeso.

RpaA es clave en el control y transmisión de la información del reloj circadiano a través de las proteínas KaiA, KaiB y KaiC. La actividad de RpaA se controla en *Synechococcus elongatus* PCC 7942 mediante la acción de dos proteínas quinasas, SasA (fosforila a RpaA) y CikA (desfosforila a RpaA) (Gutu y O'Shea, 2013), mientras que en *Synechocystis* solo se ha sugerido una interacción de la histidina quinasa Hik33 con RpaA (Shoumskaya et al., 2005). RpaA fosforilada activa genes importantes en el metabolismo en oscuridad. Esto se ha demostrado a través del análisis transcriptómico de un mutante RpaA que mostró la existencia de una serie de genes que se inducen fuertemente en luz y que están relacionados con el transporte de carbono principalmente (Köbler et al., 2018). Debido a la posible interacción entre TrxA y RpaA *in vivo*, se han analizado en STXA2 los genes que se inducen en el mutante RpaA, pero no se ha observado una relación directa entre los niveles de TrxA y cambios en posibles dianas de RpaA, a pesar de ello, su regulón todavía no se ha determinado en *Synechocystis* (Archivo S1).

RpaB es un factor transcripcional independiente al reloj circadiano que regula la expresión de genes dependientes de la luz. RpaB forma parte de un sistema de dos componentes con Hik33, una histidina quinasa sensor de estrés. Este factor se ha descrito en estudios proteómicos en *Synechococcus* sp. PCC 7002 como un factor



RESULTADOS

transcripcional que presenta una regulación *redox* (Ansong et al., 2014). Recientemente se ha identificado el regulón de RpaB en *Synechocystis*, que presenta genes inducidos o reprimidos en función de la posición de la secuencia reconocida por RpaB y denominada HLR1, y en condiciones de intensidad lumínica baja (Riediger et al., 2019). Entre los genes reprimidos se incluyen los genes relacionados con la fotoprotección, flujo cíclico, estado de transición, fotorrespiración, biosíntesis de cofactores, asimilación de nitrógeno o reloj circadiano entre otros. Entre los genes activados se encuentran genes del PSI, ficobilisomas o los sistemas CRISPR2 y CRISPR-Cas (Riediger et al., 2019). La descripción de este regulón de RpaB nos llevó a analizar posibles efectos en la actividad de RpaB, frente a una disminución en los niveles de TrxA.

En el análisis transcriptómico sin embargo no se observan diferencias significativas entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor con respecto al gen *rpaB* (Archivo S1). La retirada del inductor permite observar una disminución significativa de la expresión de este gen. Además, cuando se analizan los genes que forman parte del regulón controlado por RpaB se observan diferencias significativas en muchos de estos genes cuando se retira el inductor. Muchos de los genes activados por RpaB en condiciones estándar disminuyen significativamente su expresión tras la retirada de arsenito, concretamente 56 de los 98 genes identificados ($\log_2 > -0.90$). Entre los que se encuentran con mayores diferencias están los genes del PSI y del PBS. Respecto a los genes reprimidos por RpaB, los niveles de expresión de muchos genes aumentan tras la retirada de arsenito, como *nblA1*, *nblA2*, *hliC* o genes relacionados con la síntesis de molibdopterina (*moaA*, *moaC*, *moaE*, *moeA*), y otros relacionados con el transporte de electrones disminuyen su expresión (Archivo S1). Se ha descrito que RpaB regula negativamente hasta 21 genes que forman las diferentes subunidades del PSII o están relacionadas con su ensamblaje (Riediger et al., 2019). Es destacable que la mayoría de estos genes no presentaron diferencias significativas ($\log_2 > \pm 0.90$) en la estirpe STXA2 en ausencia de inductor (Archivo S1).

ManR es el tercer regulador transcripcional tipo OmpR que se ha identificado en estudios proteómicos ya que presenta cisteínas susceptibles de modificación *redox* (Guo et al., 2014), y como posible diana de TrxA en estudios *in vitro* (Kadowaki et al., 2015). Actúa como represor del operón *mntCAB*, que codifica un transportador de manganeso (Ogawa et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). En condiciones estándar de crecimiento, la histidina quinasa ManS se autofosforila tras unir Manganeso (Mn^{2+}), y fosforila y activa la respuesta de ManR. En condiciones de ausencia de manganeso, ManR se desfosforila y se libera del promotor, induciendo el operón (Yamaguchi et al., 2002).



La comparativa entre las estirpes WT y STXA2 en presencia de inductor muestra algunas diferencias que implican la inducción del gen *mntC* ($\log_2 = 0.92$), aunque no hay cambios en los genes *mntA* y *mntB* ($\log_2 = -0.11$ y 0.11 respectivamente) (Archivo S1). Después de retirar el inductor, los niveles de expresión del gen *mntC* se mantienen, aunque se observa un aumento en el caso de los genes *mntA* y *mntB* ($\log_2 = 0.87$ y 0.72 respectivamente). Los niveles de expresión del operón *mntCAB* son despreciables en concentraciones de MnCl_2 superiores a $1 \mu\text{M}$, debido a la represión de ManSR (Yamaguchi et al., 2002). En nuestro caso, el medio BG11C utilizado en el cultivo de las estirpes presenta una concentración de $5\text{-}10 \mu\text{M}$ de MnCl_2 , y los valores relativos de los niveles de expresión del operón son muy bajos, dentro de los 300 transcritos con menor expresión (de 3648 transcritos detectados). La posible regulación *redox* de ManR implicaría una disminución en su actividad como represor y, por lo tanto, un aumento en los niveles de expresión de los genes del operón *mntCAB* en la estirpe STXA2. Curiosamente, el transportador de Mn^{2+} de la membrana tilacoidal Mnx, codificado por el gen *sll0615*, se encuentra reprimido en la estirpe STXA2 en presencia inductor con respecto al WT ($\log_2 = -1.40$), y mantiene estos niveles de expresión tras la retirada de arsenito (Archivo S1).

6.3.4. Análisis de la regulación transcripcional de RbcR en la estirpe STXA2

Otro factor de transcripción identificado en estudios proteómicos en *Synechocystis* y en *Synechococcus* ha sido RbcR, que presenta determinadas cisteínas en su secuencia susceptibles de oxidación en los cambios luz-oscuridad y que están conservadas entre las cianobacterias (Ansong et al., 2014; Guo et al., 2014; Sadler et al., 2014). Este miembro de la familia de reguladores tipo LysR desempeña una función muy importante en el metabolismo de carbono inorgánico en cianobacterias (Burnap et al., 2015). Presenta una elevada similitud con un factor transcripcional tipo LysR ampliamente distribuido y que controla las enzimas del ciclo de CBB en α -proteobacterias (Joshi et al., 2013) o en algas rojas (Minoda et al., 2010). Aunque en cianobacterias existe poca información acerca de RbcR, se conoce que es esencial para la viabilidad celular (Omata et al., 2001), y existen datos que sugieren la posibilidad de que actúe como activador del operón *rbcLXS* (*slr0009-slr0012*).

El gen *rbcR* (*sll0998*) no presenta cambios en su expresión en la estirpe STXA2 con respecto a la estirpe WT en presencia de inductor (Archivo S1). La retirada del inductor tampoco muestra cambios en los niveles de expresión de *rbcR* en la estirpe STXA2. Sin embargo, cuando se analiza el operón *rbcLXS*, se observan diferencias significativas en los niveles de expresión en la estirpe STXA2 respecto al WT en presencia de inductor (*rbcL*, $\log_2 = 0.86$; *rbcX*, $\log_2 = 1.00$ y *rbcS*, $\log_2 = 0.92$) (Archivo



RESULTADOS

S1), que indicarían una mayor actividad de RbcR en la estirpe STXA2. La retirada del inductor produce una disminución significativa en los niveles de expresión del operón con respecto a los niveles iniciales (*rbcL*, $\log_2 = -1.52$, *rbcX*, $\log_2 = -1.72$ y *rbcS*, $\log_2 = -1.88$). Así, la disminución en los niveles de TrxA podría estar relacionada con la inactivación de RbcR.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

V. DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

El gen *trxA* es esencial en *Synechocystis* y *Synechococcus elongatus* PCC 6301 en condiciones fotosintéticas, heterotróficas y mixotróficas (Muller y Buchanan, 1989; Navarro y Florencio, 1996). Además, esta TRX parece tener un papel esencial también en organismos fotosintéticos superiores como plantas y algas pero es una cuestión que no está resuelta debido a que no se han podido generar estirpes mutantes que carezcan de todas las tiorredoxinas de tipo *m* (TrxA) (Geigenberger et al., 2017).

La secuenciación masiva de genomas de diferentes especies de cianobacterias en los últimos años nos permite realizar un análisis exhaustivo de las tiorredoxinas presentes en estos organismos. A partir de las secuencias de las tiorredoxinas de 349 genomas analizados, representadas en un árbol filogenético sin raíz (ver detalles en el apartado III.7.4), se identifican cuatro grupos principales, correspondientes a las TrxA, TrxB, TrxQ y TrxC (Figura 78).

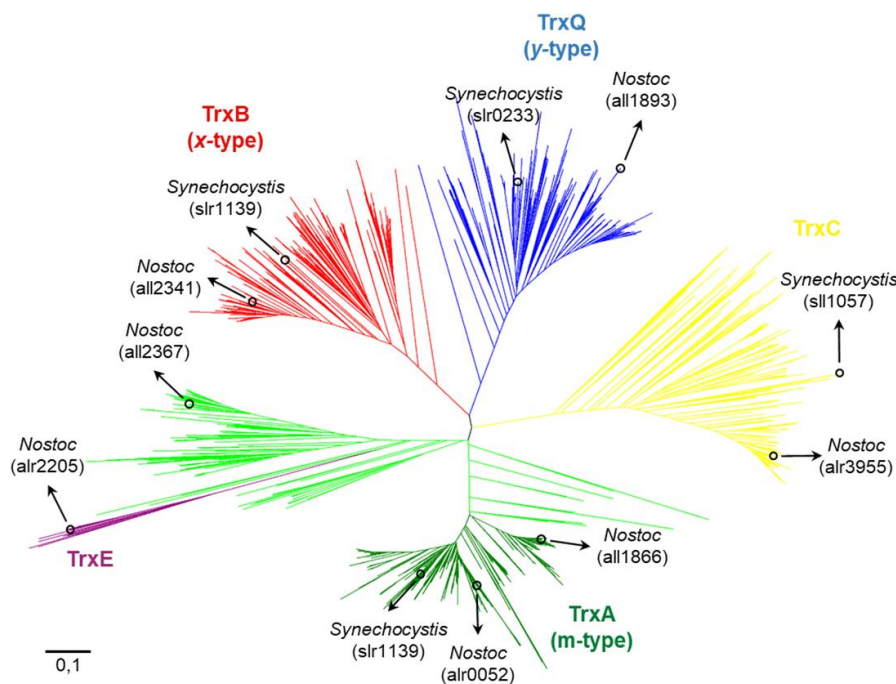


Figura 78. Árbol filogenético de las tiorredoxinas identificadas en cianobacterias secuenciadas. El árbol filogenético se ha realizado mediante MEGA 7.0.26 y utilizando las bases de datos (NCBI, Cyanobase y IMG Database). Se incluyen las tiorredoxinas presentes en los organismos modelo *Synechocystis* y *Anabaena* (*Nostoc*).

Dentro del grupo de las TrxA, se puede diferenciar un amplio subgrupo que está presente en todas las cianobacterias analizadas. Este subgrupo, además de la TrxA de *Synechocystis*, contiene una de las tres TrxA identificadas en *Anabaena* (*alr0052*), denominada Trx-*m1*. De todas las especies analizadas, 46 de ellas presentan una única TrxA que está incluida en este subgrupo, entre las que se encuentran todas las especies



de *Prochlorococcus*, *Gloeobacter* y *Atelocyanobacterium*, y algunos miembros de *Synechococcus*.

Por otro lado, la segunda TrxA identificada en *Anabaena*, denominada Trx-m2 (*all1866*), pertenece a un pequeño subgrupo cercano al anterior y donde se localizan Trx-m2 de otras cianobacterias filamentosas (Figura 78). Los estudios realizados en *Anabaena* utilizando estirpes mutantes simples de la Trx-m1 y la Trx-m2, sugieren que existe cierta capacidad de compensar la ausencia de una TRX por la otra, teniendo en cuenta la alta homología entre estas dos TRX, aunque presentan cierta especificidad en determinadas condiciones de crecimiento (Deschoenmaeker et al., 2019; Mihara et al., 2018). Finalmente, en el amplio grupo de TrxA también se puede diferenciar un subgrupo cercano al ancestro común de todas las TRX, que incluye otra TrxA de *Anabaena* (*all2367*), denominada Trx-m3. El resto de TRX se encuentran ampliamente distribuidas entre los diferentes grupos de cianobacterias, aunque no están en todas ellas.

Para estudiar el papel de esta TRX en *Synechocystis* se ha generado una estirpe mutante donde el gen *trxA* se encuentra bajo un promotor inducible por arsenito (Figura 12). La elección de este promotor, además del RBS, nos ha permitido obtener una estirpe mutante (STXA2) que presenta una relación directa entre la tasa de crecimiento y la cantidad de TrxA en concentraciones crecientes de inductor (Figura 13). Así, en presencia de 1 mM de inductor presenta una cantidad de TrxA del 10% y cuando se retira se obtiene un nivel de expresión prácticamente indetectable y unos niveles de TrxA inferiores al 1% con respecto al WT (Figura 15).

1. Función esencial de TrxA en el mantenimiento de la fotosíntesis y en el ciclo de CBB

Los estudios realizados en plantas, principalmente la caracterización de mutantes de TRX, han permitido establecer una relación entre las distintas TRX con la regulación *redox* de algunas enzimas del ciclo de CBB, la biogénesis del PSII, la síntesis de clorofila o el estrés oxidativo (Nikkanen y Rintamäki, 2019). En las cianobacterias sin embargo no se ha establecido la regulación *redox* de estas enzimas y además podría ser diferente debido a los múltiples cambios producidos durante la evolución. Un ejemplo corresponde a las enzimas FBPasa y la SBPasa de algas y plantas, que presentan un origen evolutivo distinto a las enzimas presentes en las cianobacterias (Gütle et al., 2016; Hartman et al., 1990; Martin et al., 1996; Sahrawy et al., 1996). Sin embargo, los cambios en el estado *redox* en respuesta a la luz de las TRX de *Synechocystis* que se han observado en este trabajo ponen de manifiesto el alto grado de conservación que existe en los sistemas de regulación *redox* (Figura 38).



El estudio del crecimiento de la estirpe STXA2 en presencia del inductor permitió observar que un 10% de TrxA es suficiente para crecer, en condiciones estándar de crecimiento, presentando una tasa de crecimiento del 70% con respecto a la estirpe WT (Tabla 12). Sin embargo, la retirada del inductor y la consiguiente disminución en los niveles de TrxA, condujo a una parada en el crecimiento y a fuertes cambios en el fenotipo, como una disminución en la cantidad de clorofila y de ficobiliproteínas (Figura 17). Una de las ventajas que presenta disponer de una estirpe con distintas cantidades de TrxA moduladas por la presencia o ausencia de inductor, es que permite analizar el comportamiento del mutante en diferentes condiciones. El cultivo de la estirpe STXA2 en mixotrofia o fotoheterotrofia, además de no permitir el crecimiento en ausencia de inductor, resultaron letales para la viabilidad celular (Figura 20). Este resultado pone de manifiesto el carácter esencial de TrxA para el crecimiento en diferentes condiciones nutricionales.

El análisis fotosintético de la estirpe STXA2 cuando presenta un 10% de TrxA revela cambios en el transporte de electrones con un 10% de TrxA, fundamentalmente se observó un retraso en el LET y un aumento del CET y las vías respiratorias (Figuras 21 y 30). Esta situación sugirió la posibilidad de que existiera un desequilibrio entre la generación y el consumo del NAD(P)H en el lado aceptor del PSI, responsable del aumento en el retorno de electrones a la PQ a través del CET en la estirpe STXA2. El uso de inhibidores del ciclo de CBB como el glicolaldehído o la yodoacetamida han permitido designar al CET o a las cuatro flavoproteínas presentes en *Synechocystis* como rutas alternativas eficientes en aquellas condiciones en las que los sumideros importantes del LET como el ciclo de CBB están afectados (Allahverdiyeva et al., 2011; Bulychev et al., 2018; Shimakawa et al., 2018; Xu et al., 2016). Cuando se analizaron los cambios en el NAD(P)H en presencia y ausencia de luz en la estirpe STXA2, los resultados revelaron una limitación en el ciclo de CBB (Figura 32). A diferencia de la estirpe WT, con cambios en el NAD(P)H similares a los descritos (Daley et al., 2012; Holland et al., 2015, 2016; McDonald et al., 2011), la estirpe STXA2 presentó cambios que tienen cierta similitud a los que se han observado en un mutante que no puede sintetizar glucógeno, debido a que carece de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (Holland et al., 2016). Este mutante presenta una fuerte limitación en la activación del ciclo de CBB después de un periodo de oscuridad (Holland et al., 2016), debido a las bajas concentraciones de intermediarios metabólicos que son necesarios para iniciar el ciclo de CBB (Shinde et al., 2020). Además de esta limitación en el ciclo de CBB en la estirpe STXA2, no podemos descartar una interacción directa de TrxA con componentes del aparato fotosintético, ya que nuestros resultados concuerdan con los resultados encontrados en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con bajos niveles de TRX tipo *m*,



sugiriendo un papel de estas TRX en la inhibición del CET y en la biogénesis del PSII (Courteille et al., 2013; Okegawa y Motohashi, 2015; Wang et al., 2013).

Además de estas observaciones, el análisis de los aminoácidos intracelulares mostró que existen cambios incluso en presencia de inductor. Entre las diferencias observadas destacan los mayores niveles de aminoácidos como la serina y la glicina, y los menores niveles de triptófano y fenilalanina (Figura 61). El precursor de la serina y la glicina es el 3-fosfoglicerato (3PG), que es un intermediario del ciclo de CBB generado por la actividad carboxilasa de la Rubisco, y en menor medida por la actividad oxigenasa durante la fotorrespiración (Knoop et al., 2013). Por otro lado, el triptófano y la fenilalanina se generan a partir de E4P, otro intermediario del ciclo de CBB (Knoop et al., 2013). Estos resultados podrían estar relacionados con limitaciones o desequilibrios en el ciclo de CBB.

Cuando los niveles de TrxA disminuyeron por debajo del 10% se observó una situación drástica debido a la disminución global de los componentes del aparato fotosintético analizados mediante el Dual PAM-100, electrodo de Clark y Western blot (Figuras 21, 23, 24, 27, 29 y 36). La disminución global en el aparato fotosintético, junto con la inducción de mecanismos de fotoprotección, parecen ser responsables de que no se observen cambios en el rendimiento fotoquímico (YII) durante las primeras 24 horas. Sin embargo, el análisis de la cinética de inducción-recuperación (Figura 23) y el rendimiento fotoquímico del PSII (Y(II)) (Figura 24) tras 48 horas de la eliminación del inductor puso de manifiesto una fuerte limitación en el lado aceptor del PSI. Los datos obtenidos cuando se utiliza la misma concentración de clorofila que en la estirpe WT corroboraron estas limitaciones y permitieron observar menos complejos PSII y PSI funcionales, principalmente tras 48-72 horas (Figuras 23, 27 y 29). Curiosamente, esta limitación en el lado aceptor del PSI no condujo a un aumento de ROS en el interior celular (Figura 44). Esto se explicaría debido a que en la estirpe STXA2 se produce una gran disminución en los componentes del aparato fotosintético, principal componente de la producción de ROS. Las diferencias en la producción de ROS se pusieron de manifiesto cuando se determinó la cantidad de ROS por cantidad total de proteína (Figura 44). El análisis de del NAD(P)H tras la retirada del inductor permitió establecer una relación entre los niveles de TrxA con la actividad del ciclo de CBB, mostrando una fuerte limitación en el consumo de NAD(P)H después de retirar el inductor.

La retirada de arsenito también provocó una drástica disminución en los niveles de ATP (Figura 34). Esto podría explicarse debido a una limitación en el funcionamiento del complejo ATP sintasa ya que se han identificado, a través de estudios proteómicos, proteínas dianas de TrxA en este complejo (Mata-Cabana et al., 2007). La capacidad de generar ΔpH aunque con un retraso considerable con respecto al WT (Figura 33), y la



disminución en el *pool* de nucleótidos de adenina (Figura 34), parecen asociar la disminución de TrxA con la limitación en el LET y la síntesis de *ново* de nucleótidos. Esta limitación en la síntesis de *ново* de nucleótidos está relacionada directamente con el metabolismo del carbono, de una manera similar a lo que se ha observado en un mutante que carece del regulador transcripcional RpaA y que no es viable en ciclos luz/oscuridad (Puszynska y O'Shea, 2017). Este mutante no acumula los niveles de glucógeno suficientes en los periodos de luz y tampoco expresa los genes esenciales para movilizar el glucógeno y mantener el *pool* de nucleótidos durante los periodos de oscuridad (Puszynska y O'Shea, 2017).

La relación entre los niveles de TrxA con la actividad del ciclo de CBB nos llevó a analizar el estado *redox in vivo* en las estirpes WT y STXA2 de la SBP/FBPasa, una enzima del ciclo de CBB que se activa tras la reducción por TrxA *in vitro* (Tesis Doctoral de Raquel María García Cañas). Los estudios estructurales realizados en esta enzima en *Synechocystis* y *Thermosynechococcus elongatus* han identificado un posible puente disulfuro entre dos cisteínas (C⁷⁵ y C⁸⁴), aunque los estudios con mutantes dirigidos en *Synechocystis* han sugerido la existencia de un puente disulfuro entre C⁷⁵ y C⁹⁹ y la formación de tres estados (Feng et al. 2014). Por un lado, un estado de dímero inactivo con un puente disulfuro C⁷⁵-C⁹⁹ sensible a regulación *redox*. Por otro lado, un estado de tetrámero inactivo determinado a través de la estructura cristalina del complejo AMP+SBP/FBPasa. Finalmente, un tetrámero activo en presencia de Mg²⁺ (Feng et al., 2014). El análisis proteómico realizado en *Synechocystis* también identificó a la C⁷⁵ de esta enzima entre las cisteínas sensibles a oxidarse en oscuridad, además de otras cisteínas (C¹⁶¹ y C²³⁵) (Guo et al. 2014). En la estirpe STXA2 se observó un aumento de las formas oxidadas, principalmente una forma oxidada que implica la formación de un puente entre dos cisteínas que denominamos Ox2 (Figura 41), y que supone el primer ejemplo de regulación *redox in vivo* vía TrxA descrita en *Synechocystis* (Figura 79). La forma oxidada Ox1 podría corresponder con la forma glutationilada de la cisteína C⁷⁵, que se ha descrito en el primer análisis de S-glutationilación realizado en *Synechocystis* (Chardonnet et al., 2015).

El análisis *redox in vivo* de la otra enzima con actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa, la FBPasa no reveló grandes diferencias en su estado *redox* a pesar de los resultados *in vitro* observados en nuestro grupo de investigación (Trabajo Fin de Grado de Clara Gómez Romero), sugiriendo la presencia de otros reguladores *redox*.

Con respecto a otras enzimas del ciclo de CBB, estudios recientes han establecido una regulación *redox* dependiente de la luz en las proteínas CP12 y fosforibuloquinasa (PRK), mediante la formación de puentes disulfuro (McFarlane et al., 2019; Mihara et al., 2019; Yu et al., 2020). En oscuridad, la oxidación de la CP12



provoca la formación de un complejo ternario entre la CP12 y las enzimas PRK y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que conlleva a la inactivación de las dos enzimas (McFarlane et al., 2019). La enzima PRK también presenta un puente disulfuro sensible a oxidación que es independiente a la CP12 y a la formación del complejo (Yu et al., 2020). En luz, la reducción de la CP12 y la PRK permiten la actividad de la propia PRK y de la GAPDH. La TrxA podría estar involucrada en la reducción y activación de estas dos proteínas. Tanto la PRK como otras enzimas del ciclo de CBB e incluso proteínas que forman parte de los carboxisomas se han identificado entre las posibles dianas de TrxA en los estudios previamente realizados por nuestro grupo (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006) (Figura 79). Esto implica que existiría en la estirpe STXA2 una relación entre el estado *redox* de estas proteínas, junto a la SBP/FBPasa, y los cambios observados en esta estirpe asociados con una limitación en el ciclo de CBB.

El análisis fotosintético de la estirpe STXA2 también ha revelado la existencia de cambios durante las transiciones a la oscuridad (Figuras 25, 30 y 32), incluyendo una mayor tasa respiratoria (Figuras 27 y 30). La acumulación de intermediarios metabólicos debido a limitaciones en el ciclo de CBB podrían estar directamente relacionado con esta situación. A pesar de esto, los resultados también sugieren una participación de TrxA en la regulación de procesos inactivos en luz y activos en los periodos de oscuridad. Un ejemplo de esta regulación *redox* podría implicar a la OpcA, proteína activadora de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). En *Anabaena* se ha observado un aumento en los niveles de la forma oxidada de la OpcA en una estirpe mutante de una de las dos isoformas de TrxA, *trx-m1* (Mihara et al., 2018). La activación parcial de la G6PDH en luz conllevaría a producir pérdidas del carbono fijado por el ciclo de CBB, mientras que podría provocar un aumento del flujo catabólico en las transiciones a oscuridad.



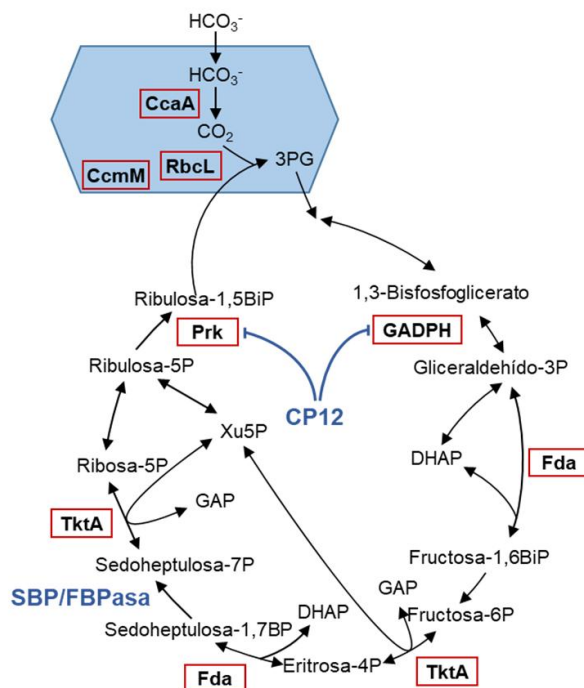


Figura 79. Enzimas del ciclo de CBB con regulación redox. Las enzimas dentro de un cuadrado con borde rojo indica las que han sido identificadas en estudios proteómicos de interacción con TrxA (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006). La enzima SBP/FBPasa y la proteína CP12 se marcan en azul.

Además del metabolismo del carbono, la TrxA se ha relacionado con otros procesos celulares a través de estudios proteómicos (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Nomata et al., 2015; Pérez-Pérez et al., 2006). En STXA2, la disminución de los niveles de TrxA por debajo del 10% implica que en las primeras 12 horas solo se observe un pequeño aumento de la concentración de clorofila, para posteriormente permanecer constante durante las próximas 96 horas. Este resultado implica que hay una disminución de la cantidad de clorofila por célula debido al desequilibrio entre la síntesis de *novo* y el reciclaje de las moléculas de clorofila existentes. Teniendo en cuenta que la vida media de la clorofila en cultivos de *Synechocystis* es de 200 horas en nuestras condiciones estándar de crecimiento (Vavilin et al., 2005), y que se han identificado posibles proteínas diana relacionadas con la síntesis de clorofila (Lindahl y Florencio, 2003; Mata-Cabana et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2006), nuestros resultados sugieren que la disminución en los niveles de TrxA estaría limitando este proceso.



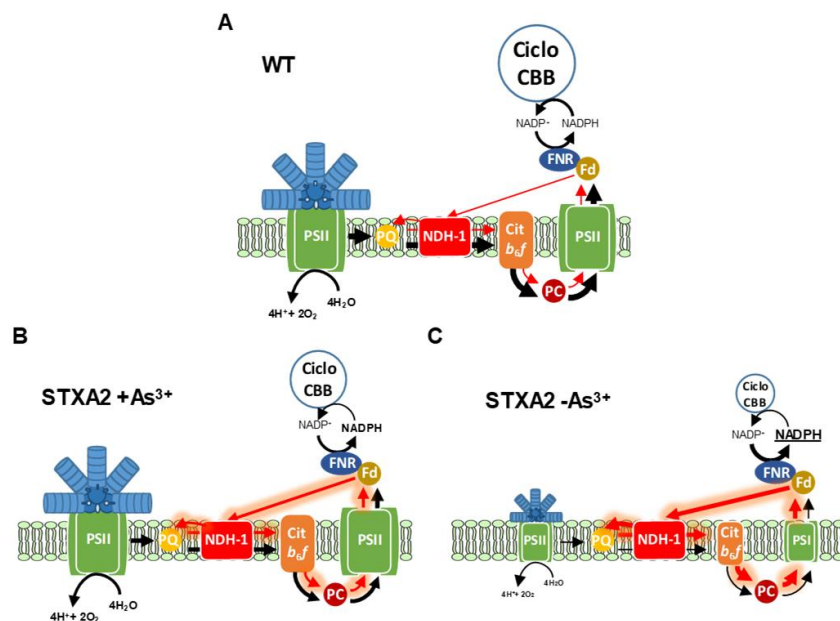


Figura 80. Cambios en el transporte de electrones y en el aparato fotosintético en la estirpe STXA2. Modelo propuesto a partir de la caracterización realizada en la estirpe STXA2 con diferentes niveles de TrxA.

En resumen, la estirpe STXA2 con un 10% de TrxA presenta cambios en el transporte de electrones debido a limitaciones en el ciclo de CBB, que produce principalmente un aumento en el CET (Figuras 80A y 80B). La disminución en los niveles de TrxA por debajo del 1% conlleva una disminución en los componentes del aparato fotosintético relacionados con el LET y a un aumento en la limitación en el ciclo de CBB, que provoca un incremento en el CET y otras rutas auxiliares (Figura 80C).

2. Papel de TrxA en la regulación redox de la 2-Cys Prx y en la defensa a estrés oxidativo

El cambio en las condiciones de crecimiento puede provocar la generación de ROS principalmente debido a la fotosíntesis, como hemos comentado anteriormente. Para evitar que estos compuestos puedan producir la oxidación e inactivación irreversible de proteínas sensibles, los organismos fotosintéticos han desarrollado una serie de mecanismos (Zaffagnini et al., 2018). Entre los principales sistemas de detoxificación destacan los llevados a cabo por las PRX y por la catalasa-peroxidasa (Hosoya-Matsuda et al., 2004). La interacción *in vitro* observada entre las PRX y las diferentes TRX (Pérez-Pérez et al., 2009b), nos llevó a analizar el estado *redox in vivo* de una de las principales PRX, la 2-Cys Prx. El análisis reveló como la 2-Cys Prx se encuentra principalmente como monómero en la estirpe WT, aunque también se observa un porcentaje en forma de dímero (Figura 43). La disminución en los niveles de



TrxA en la estirpe STXA2 condujo a un aumento del dímero, estableciendo una relación directa entre los niveles de TrxA y el estado *redox* de la 2-Cys Prx. Este resultado es la primera evidencia *in vivo* de la relación entre una TRX con alguna PRX en las cianobacterias. A pesar de esto, otras cianobacterias presentan un sistema alternativo en la reducción de la 2-Cys Prx como es la NTRC, poniendo de manifiesto la diversidad de sistemas existente entre las cianobacterias (Mihara et al., 2016; Sánchez-Riego et al., 2016).

Las PRX actúan principalmente durante los periodos de adaptación a elevadas intensidades lumínicas y frente a estrés oxidativo (Pérez-Pérez et al., 2009b; Stork et al., 2005). La caracterización de mutantes que carecen de la 2-Cys Prx ha demostrado que esta proteína es necesaria para el crecimiento en altas intensidades lumínicas en *Synechocystis* (Klughammer et al., 1998) y en *Synechococcus* (Alexander et al., 2003). Otro mutante en *Synechocystis* que carece de la PrxII presenta un severo retraso en el crecimiento a intensidad de luz normal y es extremadamente sensible a alta intensidad lumínica, mientras que un mutante que carece de la 1-Cys Prx presenta solo un leve retraso (Hosoya-Matsuda et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Los estudios realizados con la estirpe STXA2 permitieron observar un aumento en la sensibilidad a estrés oxidativo por H₂O₂ o MV, un compuesto que acepta electrones del PSI y genera ROS (Krieger-Liszkay et al., 2011), incluso en presencia de inductor (Figuras 45 y 46). Por otro lado, la transición a alta intensidad lumínica provocó en la estirpe STXA2 una mayor inducción del principal componente del NPQ en cianobacterias, la proteína OCP (Figura 50), mientras que la exposición prolongada resultó letal para la estirpe STXA2 sin inductor (Figura 47). Como hemos comentado anteriormente, los estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo permitieron observar como TrxA puede interaccionar con las cinco PRX presentes en *Synechocystis* y donar los electrones necesarios para que estas PRX puedan llevar a cabo su actividad peroxidasa (Pérez-Pérez et al., 2009b). De esta forma, los resultados obtenidos en la estirpe STXA2 posiblemente estén relacionados con una limitación en la regeneración de la forma reducida de la 2-Cys Prx y de otras PRX, debido a los bajos niveles de TrxA.

3. Posible control *redox* en la traducción de proteínas y estado de dormancia

Como hemos comentado en la *Introducción*, los estudios proteómicos han permitido la identificación de posibles proteínas dianas relacionadas con numerosos procesos celulares. El análisis mediante microscopía electrónica y la cuantificación de diferentes componentes celulares en la estirpe STXA2 mostraron fuertes cambios morfológicos, la acumulación de glucógeno y cianoficina, y una disminución en la cantidad total de proteínas cuando los niveles de TrxA disminuyeron por debajo del 10%



(Figuras 51-57). La cianoficina, formada por multi-L-arginil-poli-(L-aspártico) y presente en la mayoría de cianobacterias, no supera el 1% del total del peso seco en fase exponencial (Watzer et al., 2015). Sin embargo, este polímero se acumula en condiciones de estrés lumínico o limitación de nutrientes como sulfato, fosfato o potasio (Allen et al., 1980; Watzer et al., 2015). También se han detectado grandes cantidades de cianoficina tras inhibir la traducción de proteínas (Allen et al., 1980). Debido a esto, se analizó la posible influencia de la disminución de TrxA en el proceso de síntesis de proteínas.

El análisis de la síntesis de proteínas en la estirpe STXA2 reveló fuertes diferencias en la entrada e incorporación a las proteínas de los aminoácidos marcados metionina y cisteína ($^{35}\text{S-Met/Cys}$) (Figura 59). Este resultado sugiere una posible regulación *redox* del proceso de síntesis de proteínas, que implicaría una fuerte acumulación de cianoficina en la estirpe STXA2, procedente del nitrógeno del medio de cultivo (NaNO_3) y de la degradación de la ficobiliproteínas. La aparición y el fuerte incremento del reservorio de cianoficina, no permitió observar grandes cambios en los niveles de aspártico y arginina, evidenciando una efectiva formación de este polímero (Figura 61). A pesar de esto, la cantidad total de aminoácidos aumentó y los cambios en algunos aminoácidos parecen indicar regulaciones a nivel del metabolismo del carbono/nitrógeno. Entre las posibles proteínas dianas identificadas en los estudios proteómicos realizados por nuestro grupo de investigación, se encuentran proteínas ribosomales 30S (S3, S2 y S10), 50S (L3 y L28), las enzimas valil-tRNA sintetasa y lisil-tRNA sintetasa y dos factores de elongación (EF-G y EF-Tu). Con respecto a los factores de elongación, el marcaje de proteínas con $^{35}\text{S-Met/Cys}$ ha demostrado como la presencia de ROS en *Synechocystis* produce la oxidación de los factores de elongación EF-G y EF-Tu (Kojima et al., 2007, 2009; Yutthanasirikul et al., 2016), e inhibe la síntesis de proteínas de *novo*, esencial para la reparación de la D1 (Nishiyama et al., 2001, 2004). La sobreexpresión de dos de los tres EF-G presentes en *Synechocystis* (Kojima et al., 2007), o la sustitución de la C^{105} por serina de uno de ellos (Ejima et al., 2012), permiten aumentar la tolerancia a estrés oxidativo por H_2O_2 y proteger al PSII de la fotoinhibición. De la misma forma, la oxidación de la única cisteína presente en el EF-Tu (C^{85}), produce la formación de un puente disulfuro intermolecular y de ácido sulfénico, y la inactivación de este factor (Yutthanasirikul et al., 2016). La expresión de un EF-Tu con esta cisteína sustituida por serina también mejora la síntesis de proteínas de *novo* y protege al PSII de la fotoinhibición (Jimbo et al., 2018). El análisis de la D1 en la estirpe STXA2 mostró una fuerte disminución en los niveles de proteína (Figura 36), a pesar de que no se observaron diferencias en los niveles de expresión de los genes *psbA1*, *psbA2* y *psbA3* (Figura 72). Estos datos, junto con los resultados obtenidos en el marcaje con



³⁵S-Met/Cys, posiblemente están relacionados con la oxidación de alguno de los factores de elongación o con algunas proteínas ribosomales.

Las cianobacterias no diazotróficas presentan mecanismos para hacer frente a periodos sin alguno de los nutrientes necesarios, como por ejemplo el nitrógeno, el azufre o el fósforo. La ausencia de algún nutriente produce cambios morfológicos y metabólicos que conducen a que la célula sintetice polímeros de reserva en lugar de la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, y a la entrada en un estado de quiescencia. Este estado se caracteriza por la presencia de células cloróticas debido a la degradación de los PBS, principalmente en ausencia de nitrógeno (Forchhammer y Schwarz, 2019). En *Synechocystis*, los estudios de limitación de nitrógeno han puesto de manifiesto como la degradación de estos PBS permite obtener aminoácidos de manera transitoria para la síntesis de proteínas (Kiyota et al., 2014). En la estirpe STXA2, la disminución en la cantidad de TrxA provocó la parada del crecimiento (Figura 15), y fuertes cambios morfológicos y metabólicos (Figuras 51-57), que conducen a las células a un estado que presenta similitudes con el estado de quiescencia y que se puede observar durante 6 días, revelando la necesidad de unos niveles mínimos de TrxA para mantener las células vegetativas. A diferencia de lo observado en células con déficit de nitrógeno (Kiyota et al., 2014), donde los aminoácidos se acumulan de manera transitoria, la limitación en la síntesis de proteínas observada en la estirpe STXA2 sin inductor impide utilizar esos aminoácidos (Figura 61). La disminución de los PBS en la estirpe STXA2 puede ser el resultado de la incapacidad de sintetizar nuevas ficobiliproteínas además de degradar las existentes. Esta degradación podría ser responsable, junto con la limitación en el ciclo de CBB, del aumento de determinados aminoácidos y de la síntesis de cianoficina. Además, el mutante STXA2 presentó un aumento de los genes *nblA1* y *nblA2* (Figura 72), relacionados directamente con la degradación del PBS (Baier et al., 2001). La mayoría de los aminoácidos con excepción de alanina, triptófano y lisina dependen de la presencia de NblA1 y NblA2 en condiciones limitantes de nitrógeno, como se ha observado en un mutante que carece de estas proteínas y que no realiza el proceso de clorosis (Kiyota et al., 2014).

La adición de inductor de nuevo permitió recuperar los niveles de TrxA (Figura 62) e iniciar la recuperación de una manera similar a las células cloróticas por déficit de nitrógeno (Klotz et al., 2016). Estas células cloróticas mantienen la viabilidad celular durante periodos prolongados debido a que presentan una fotosíntesis residual (Sauer et al., 2001). La adición de nitrato al medio sigue un programa de desarrollo que se inicia con la activación del catabolismo de glucógeno, un aumento en la actividad respiratoria y un aumento en los niveles de ATP (Doello et al., 2018; Klotz et al., 2016). En el caso de la estirpe STXA2, la recuperación del nivel inicial de TrxA condujo a la movilización



de glucógeno (Figura 64), que provocó un aumento de la tasa respiratoria independiente de las condiciones de luz (Figura 66), y de los niveles de ATP después de 12 horas (Figuras 67). El glucógeno es una fuente de energía y carbono ya que también permite generar intermediarios metabólicos en esta primera fase. A pesar de estas similitudes, la estirpe STXA2 contiene altos niveles de cianoficina que también es movilizada tras la recuperación de los niveles de TrxA (Figura 64), que relaciona a TrxA con el proceso de síntesis de proteínas como se ha descrito antes.

La adición de nitrato a células cloróticas también produce un incremento transitorio en los niveles de algunos aminoácidos debido a la incorporación de nitrógeno y a la supresión inicial de la síntesis de proteínas (Kiyota et al., 2014). El análisis de los niveles de aminoácidos en la estirpe STXA2 tras añadir el inductor también permitió observar cambios, como la disminución de la serina, la alanina o la treonina tras 12 horas (Figura 71). Por otro lado, el fuerte incremento de la arginina y de otros aminoácidos como la prolina, el GABA o la lisina posiblemente están relacionados con la movilización de la cianoficina (Figura 71). En el caso de la glicina, el aumento en sus niveles durante las primeras horas de la recuperación podrían estar relacionados con un aumento de la actividad fotorrespiratoria de la Rubisco, que genera una pequeña fracción de la glicina en condiciones estándar de crecimiento (Knoop et al., 2013).

De la misma forma que las células cloróticas (Klotz et al., 2016), las células del mutante STXA2 recuperaron la mitad de los pigmentos fotosintéticos (Figura 63), además de la actividad fotosintética (Figura 66), y comenzaron a dividirse (Figura 62) después de 24 horas. Curiosamente, los niveles ³⁵S-Met/Cys no recuperaron los valores iniciales hasta que los niveles de cianoficina fueron lo suficientemente bajos (Figura 68).

Los estudios que se han llevado a cabo en plantas han puesto de manifiesto la posibilidad de que NTRC y FTR/TRX actúen como vías paralelas en la activación o inactivación de distintas proteínas diana en el cloroplasto (Yoshida y Hisabori, 2016). La amplia distribución de la NTRC entre las cianobacterias, además de la presencia de NTRC junto al sistema FTR/TrxA en muchas de ellas, planteó la posibilidad de que NTRC pudiera complementar los efectos de la disminución de los niveles de TrxA en la estirpe STXA2 en *Synechocystis*, que carece de NTRC. El gen *ntrC* de *Anabaena* se introdujo en las estirpes WT y STXA2, utilizando el promotor P_{cpcB} (constitutivo), y generando las estirpes mutantes SNTRC y STXA2C (Figura 81).

El análisis del fenotipo de la estirpe STXA2C después de retirar el inductor del medio, además de la estirpe SNTRC (Figuras 81C-81E), permite observar el mismo fenotipo que las estirpes parentales STXA2 y WT respectivamente. Esto indica que la expresión de esta proteína en *Synechocystis* no parece ser una vía paralela al sistema FTR/TRX en *Synechocystis*, y refuerza la idea de esencialidad de TrxA.



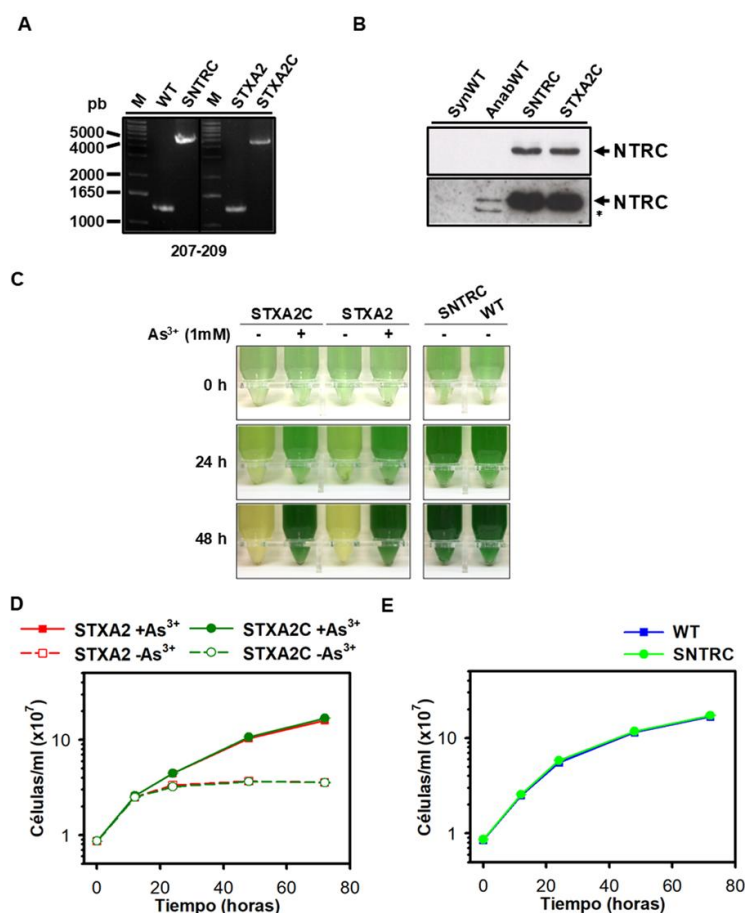


Figura 81. Análisis de las estirpes SNTRC y STXA2C. (A) Análisis mediante PCR del grado de segregación de las estirpes mutantes SNTRC y STXA2C con los oligonucleótidos 207 y 209 indicados en la Tabla 7. (B) Análisis mediante Western blot de los niveles de NTRC en las estirpes SNTRC y STXA2C. Se realizaron extractos solubles a partir de células de las estirpes WT de Anabaena y Synechocystis, y de las estirpes mutantes STXA2, SNTRC y STXA2C. Se cargaron 10 µg de proteínas para la electroforesis en geles SDS-PAGE. (C) Fotografías de los cultivos de las estirpes SNTRC y STXA2C durante una cinética estándar de crecimiento (D) Curva de crecimiento de las estirpes STXA2 y STXA2C en ausencia y en presencia de 1 mM de arsenito en el medio y en condiciones estándar de crecimiento. (E) Curvas de crecimiento de las estirpes WT y SNTRC en condiciones estándar de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes en D y E.

4. Posible control redox de TrxA sobre factores transcripcionales

El análisis mediante RNA-Seq realizado en este trabajo es el primer estudio de los efectos transcripcionales de la disminución de los niveles de una TRX en organismos fotosintéticos, contribuyendo además a la comprensión de las funciones celulares de TrxA. Muchos de los efectos en el perfil de expresión de los genes posiblemente están



relacionados directa o indirectamente con la modificación de proteínas diana de TrxA, incluidos los factores de transcripción.

En general, la estirpe STXA2 con niveles del 10% de TrxA y con diferencias fenotípicas leves solo permitió observar cambios en el regulón del factor transcripcional FurA (Figura 75). Estos cambios parecen estar relacionados con un efecto directo o indirecto de la disminución en los niveles de TrxA en esta estirpe con respecto al WT. El análisis mediante Western blot de los niveles de FurA en la estirpe STXA2 reveló un aumento del 40% aproximadamente con respecto al WT, que podría estar relacionada con la mayor respuesta de represión en la estirpe STXA2.

En los últimos años se han publicado estudios en *Synechocystis* que han revelado un mecanismo de respuesta a condiciones limitantes de hierro en el cuál están implicadas las proteasas FTSH. *Synechocystis* contiene cuatro subunidades FTSH (FTSH1-4) que se ensamblan en homo y heterocomplejos específicos. El estudio de dos mutantes simples que presentan niveles bajos de FTSH1 y FTSH3 ha asignado al complejo FTSH1/FTSH3 una función importante en la respuesta a condiciones limitantes de hierro, ya que interviene en la degradación de FurA (Krynická et al., 2014, 2019). Estos mutantes presentan niveles elevados de FurA incluso en condiciones estándar de crecimiento y Fe^{2+} en el medio, provocando cambios en la expresión de los genes regulados por FurA y en los niveles de proteína (Krynická et al., 2019). En condiciones limitantes de Fe^{2+} no se degrada FurA y no se inducen los genes del regulón a diferencia de la estirpe WT, donde los niveles de FurA disminuyen fuertemente y se inducen los genes del regulón de FurA (Krynická et al., 2019). Las subunidades FTSH2 y FTSH4 se identificaron en estudios de proteómica como posibles dianas de TrxA en nuestro grupo (Mata-Cabana et al., 2007), mientras que las subunidades FTSH2, FTSH3 y FTSH4 se identificaron en el estudio proteómico de identificación de cisteínas susceptibles a regulación por luz-oscuridad (Guo et al., 2014). Además, todas las subunidades presentan una alta homología y contienen una sólo cisteína que está muy conservada entre los organismos fotosintéticos. De esta forma, la respuesta transcripcional de la estirpe STXA2 en presencia de inductor, muy similar a la respuesta de un mutante que carece del complejo FTSH1/FTSH3 (Krynická et al., 2019), sugiere una posible regulación *redox* de TrxA sobre las subunidades FTSH1 y/o FTSH3. Los bajos niveles de TrxA en la estirpe STXA2 podrían provocar la oxidación e inactivación parcial de los complejos FTSH1/FTSH3 y FTSH2/FTSH3, que sería responsable de los mayores niveles de FurA observados y de la represión del regulón (Figuras 75 y 76).

Por otro lado, los estudios realizados en *Anabaena* establecieron una relación entre FurA y el transporte de electrones fotosintético. La proteína FurA en *Anabaena* presenta cinco cisteínas, cuatro de ellas forman dos motivos CXXC y una de ellas es



utilizada para el reconocimiento al sitio de unión en el ADN y para la unión de Fe^{2+} (Botello-Morte et al., 2014). Cuando FurA es transcripcionalmente activa, un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas ($\text{C}^{133}\text{-C}^{104}$), permite que otra de las cisteínas (C^{101}) pueda unir el Fe^{2+} correpresor. Un cambio *redox* intracelular, podría generar un nuevo puente intramolecular entre $\text{C}^{101}\text{-C}^{104}$, retirando el Fe^{2+} e inactivando FurA. Sin embargo, no se han obtenido resultados que establezcan una vía reductora de FurA no obtuvieron resultados, y parece que ni las TRX ni las GRX interaccionan con FurA (Botello-Morte et al., 2014). A pesar de esto, los estudios proteómicos en *Synechocystis* han identificado cambios en el estado *redox* de una de las cisteínas (C^{158}) de FurA frente a cambios luz-oscuridad (Guo et al., 2014). *Synechocystis* presenta cuatro de las cinco cisteínas comentadas anteriormente, conservando el motivo principal $\text{C}^{100}\text{-C}^{103}$ ($\text{C}^{101}\text{-C}^{104}$ en *Anabaena*) y dos cisteínas libres C^{132} y C^{140} (C^{133} y C^{141} en *Anabaena*). En cambio, *Synechocystis* no presenta la cisteína C^{144} de *Anabaena*, pero presenta otra cisteína que no se encuentra en *Anabaena*, C^{158} , y que se ha identificado en el análisis del proteoma *redox* (Guo et al., 2014). Nuestros resultados no permiten obtener resultados concluyentes, aunque la necesidad de condiciones reductoras para que FurA lleve a cabo la actividad represora y la elevada actividad de FurA en la estirpe STXA2 parecen descartar una relación directa entre TrxA y FurA, aunque si podría existir una relación indirecta posiblemente a través de FTSH.

Una de las hipótesis es que la situación de bajos niveles de TrxA parece inducir unas condiciones de oscuridad respecto al perfil de expresión, debido a que se observan cambios en muchos genes que están fuertemente regulados por los ciclos luz-oscuridad (Saha et al., 2016). La mayoría de los genes relacionados con la fotosíntesis, la síntesis de ATP o el ciclo de CBB disminuyen sus niveles de expresión tras disminuir los niveles de TrxA por debajo del 10% (Figuras 72 y 73). Estos cambios ocurren en los mismos términos descritos para los periodos de oscuridad. Sin embargo, los genes cuyos niveles de expresión no cambian o aumentan significativamente los niveles de expresión en oscuridad (Saha et al., 2016), muestran la misma respuesta tras la disminución de TrxA (Figura 82). Como se ha comentado anteriormente, se observó la inducción de los genes *nblA1* y *nblA2*. También se inducen genes relacionadas con la fotoprotección de los complejos fotosintéticos, como los genes *hliA*, *hliB*, *hliC*. Los estudios recientes de las proteínas que codifican estos genes han indicado un papel en la fotoprotección del complejo HliC/D mediante la unión al módulo de ensamblaje de la proteína D1 recién sintetizada y unida a clorofila, y al módulo resultante de la unión D1/D2. Por otro lado, el heterodímero HliA/B fotoprotege al módulo CP47 recién sintetizado hasta su unión al complejo D1/D2 (Komenda y Sobotka, 2016).



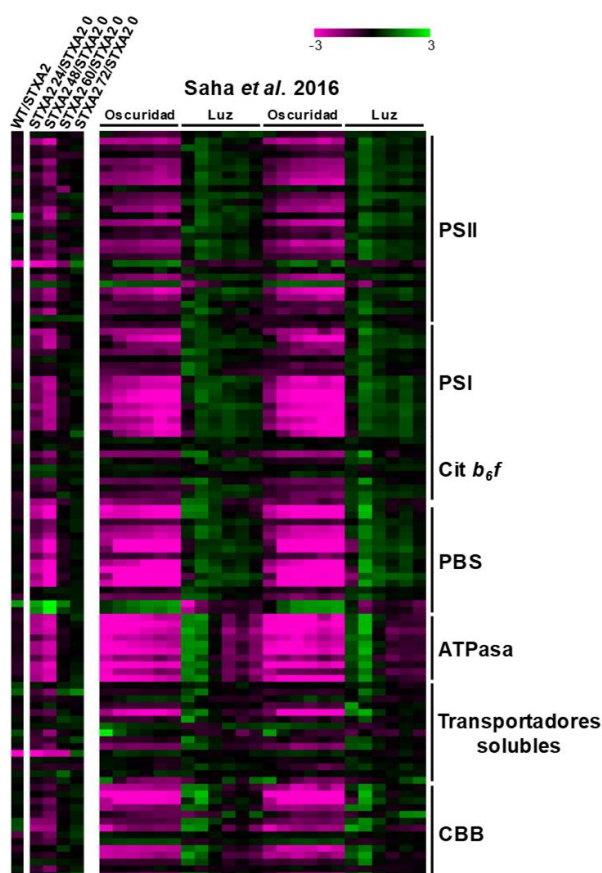


Figura 82. Comparativa del RNA-seq de este trabajo con los cambios en la expresión en los ciclos luz-oscuridad de Saha et al., 2016. Los genes relacionados con la cadena de transporte de electrones se agruparon y los cambios en los niveles de expresión se representaron con el programa Multiple Experiment Viewer 4.9. El rango de color es desde fucsia ($\log_2 = -3$) hasta verde ($\log_2 = 3$).

En los últimos años se han identificado numerosos reguladores transcripcionales en los estudios de proteómica *redox* llevados a cabo en cianobacterias (Ansong et al., 2014; Guo et al., 2014; Sadler et al., 2014), junto a otros estudios bioquímicos y de interacción con TRX (Botello-Morte et al., 2014; Kadowaki et al., 2015; Nakamura y Hihara, 2006). Esto nos llevó a plantear la posibilidad de una regulación *redox* de algunos reguladores transcripcionales a través de TrxA, por lo que analizamos los factores transcripciones con regulones conocidos.

El análisis reveló cambios en el regulón de un factor transcripcional estudiado en *Synechocystis*, PedR. Los análisis bioquímicos realizados con este factor, además de los estudios realizados con la estirpe mutante *PedR*, han identificado los genes regulados y han establecido una regulación *redox* debido a su capacidad de interacción *in vitro* con TrxA y TrxB (Nakamura y Hihara, 2006). Se propone un modelo en el que



PedR está principalmente oxidado en condiciones de intensidad lumínica baja y activa la expresión de los genes *chlL*, *chlN* y *chlB* de la enzima protoclorofilida reductasa independiente de luz e implicada en la síntesis de clorofila, y un gen de función desconocida (*slr1957*). Además, reprime el gen *ndhD2* que codifica una subunidad del complejo NDH-1, el gen *rpe* que codifica la enzima pentosa-5-fosfato-3-epimerasa, y el operón *pedR-sll0296*. El aumento en la intensidad lumínica produce la reducción e inactivación de PedR, que conlleva cambios en los niveles de expresión de sus genes diana (Horiuchi et al., 2010). Nuestros resultados transcriptómicos indicaron una conexión entre TrxA y el estado *redox* de PedR, donde probablemente la disminución en los niveles de TrxA produce la oxidación e inactivación de este factor (Figura 83). Además, el análisis del regulón de PedR permite observar cambios en los niveles de expresión relacionados con los ciclos luz-oscuridad (Saha et al. 2016). Esta situación contrasta con el modelo inicial descrito, donde PedR se reduce e inactiva sólo de forma transitoria en alta intensidad lumínica (Horiuchi et al., 2010).

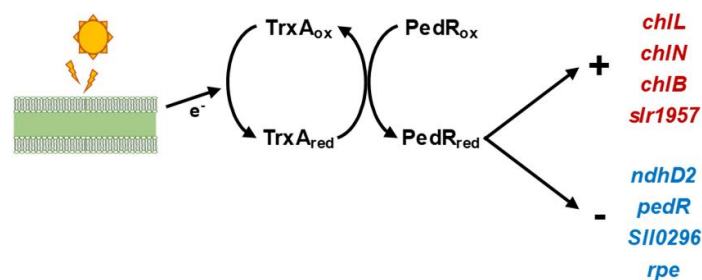


Figura 83. Modelo propuesto de regulación *redox* de PedR a través de TrxA. Regulación *redox* de PedR a partir de los resultados obtenidos en este trabajo y con los datos preliminares existentes.

Por otro lado, un estudio de interacción identificó varios factores transcripcionales de tipo OmpR como posibles dianas de TrxA y TrxB (Kadowaki et al., 2015). Algunos de estos factores como RpaB también se han detectado como factores transcripcionales dependientes del estado *redox* en estudios proteómicos en *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ansong et al., 2014). El estudio transcriptómico realizado en este trabajo parece confirmar la posible conexión entre TrxA y RpaB, debido a los cambios en los niveles de expresión observados del regulón (Archivo S1), aunque la posible red de reguladores transcripcionales presentes en las cianobacterias dificulta la interpretación de los resultados.

RpaB forma parte de un sistema de dos componentes con Hik33 como se ha comentado anteriormente. Algunos estudios realizados en *Synechococcus* y *Synechocystis* han establecido una relación entre el nivel de fosforilación y la unión al ADN, disminuyendo en respuesta a alta luz (López-Redondo et al., 2010; Moronta-



Barrios et al., 2012; Puszyńska y O'Shea, 2017; Riediger et al., 2019). Además y en el último año se ha identificado el regulón de RpaB en *Synechocystis*, con 98 genes activados y 196 genes reprimidos en condiciones de intensidad lumínica baja y de diferentes procesos celulares (Riediger et al., 2019).

RpaB presenta una cisteína (C⁵⁹) en su secuencia de aminoácidos, localizada cerca del aspártico (A47) que es responsable de la fosforilación (Wilde y Hihara, 2016). El estado *redox* de C⁵⁹ puede afectar a la transferencia del grupo fosfato de Hik33 a RpaB o a la estabilidad de la forma fosforilada. RpaB es un factor transcripcional esencial y se ha descrito que los niveles de fosforilación mantienen unos niveles constantes en luz continua, manteniendo activos genes del PSI y PBS (Piechura et al., 2017). Las distancias de las secuencias HLR1 identificadas con los sitios de inicio de la transcripción determinan la actividad de RpaB como represor o activador. Respecto a los genes activados en luz normal, RpaB puede reclutar la ARN polimerasa y estimular la transcripción, debido a la presencia de HLR1 en posiciones alejadas de los promotores. La presencia de HLR1 cerca de los promotores produce una interferencia de RpaB en el inicio de la transcripción en los genes reprimidos (Riediger et al., 2018). En nuestras condiciones experimentales, la disminución progresiva en los niveles de TrxA podría llevar a cambios en los niveles *redox* de RpaB, dificultando la fosforilación y limitando la actividad de este factor transcripcional como activador de los genes del PSI y PBS (Archivo S1). De esta forma, RpaB puede ser responsable de la relación existente entre los niveles de expresión de los genes del PSI y PBS con los ciclos luz-oscuridad, inducidos en luz y reprimidos en oscuridad (Saha et al., 2016). Respecto a los genes reprimidos, es probable que existan señales independientes y diferentes, teniendo en cuenta la diversidad de genes identificados, desde genes relacionados con distintos tipos de estrés hasta genes del PSII. A diferencia de los genes del PSI y PBS, algunos genes del PSII no se reprimen ni se inducen en la estirpe STXA2 después de la retirada del arsenito, lo que implica que está relacionado con una baja actividad de represión RpaB sobre estos genes. A pesar de esto, los genes del PSII, esenciales para el mantenimiento de la fotosíntesis, también se regulan por los ciclos luz-oscuridad (Saha et al., 2016), debiendo existir otras señales reguladoras. Otra posibilidad sería la implicación de RpaA, otro factor transcripcional del tipo OmpR que también puede estar regulado por TrxA (Kadowaki et al., 2015).

Otro factor transcripcional del tipo OmpR es ManR, que se fosforila y activa por la histidina quinasa ManS en presencia de Mn²⁺, y reprime el operón *mntCAB* (Ogawa et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). A pesar de que los cambios en los niveles de expresión sugieren una regulación *redox* mediada por TrxA de ManR, los resultados obtenidos no han llegado a una conclusión y se necesitarán experimentos con diferentes



DISCUSIÓN

concentraciones de manganeso debido a que en las condiciones experimentales hay una represión del regulón por la elevada concentración de manganeso en el medio de cultivo.

En resumen, el estudio presentado sobre el mutante STXA2, con bajos niveles de TrxA, apunta claramente al papel esencial de dicha tiorredoxina en procesos celulares centrales como el ciclo de CBB o la síntesis de proteínas.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

VI. CONCLUSIONES

203

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

CONCLUSIONES

1. Se ha generado una estirpe mutante en *Synechocystis* (STXA2) que presenta niveles muy bajos de la tiorredoxina TrxA al controlar el gen *trxA* mediante un promotor inducible por arsenito.
2. La estirpe STXA2 tiene como máximo un 10% de la proteína TrxA con respecto a la estirpe silvestre. Niveles inferiores de TrxA provocan una pérdida progresiva del aparato fotosintético.
3. El análisis del flujo de electrones indica que la TrxA desempeña un papel esencial en el mantenimiento del transporte lineal de electrones y no parece regular rutas alternativas como el transporte cíclico de electrones o la respiración.
4. El análisis del funcionamiento del ciclo de Calvin-Benson-Bassham y del estado *redox* de la enzima SBPasa/FBPasa en la estirpe STXA2 demuestra la regulación *redox in vivo* por TrxA.
5. La estirpe STXA2 es sensible tanto a estrés oxidativo como estrés lumínico. El análisis del estado *redox* de la 2-Cys Prx en la estirpe STXA2 demuestra la conexión *in vivo* entre TrxA y esta peroxirredoxina.
6. La síntesis de proteínas es dependiente de la presencia de TrxA. En bajos niveles de TrxA se acumula glucógeno y cianoficina al disminuir la síntesis de proteínas.
7. El análisis transcripcional de la estirpe STXA2 indica que en bajos niveles de TrxA se reprimen los genes relacionados con el proceso fotosintético y el ciclo de Calvin-Benson-Bassham.
8. El análisis transcripcional de la estirpe STXA2 también pone de manifiesto la relación de TrxA con factores transcripcionales como FurA, PedR o RpaB, relacionados con el metabolismo del hierro, la fotosíntesis o los ciclos día/noche.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

VII. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000018465

CSV

GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/04/2020 11:43:51 Horario peninsular



GEISER-96b5-057f-ec51-4d76-97a5-8dce-6e87-eabb

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, A.M., Snellenburg, J.J., Gwizdala, M., Kirilovsky, D., van Grondelle, R., y van Stokkum, I.H.M. (2016). Resolving the contribution of the uncoupled phycobilisomes to cyanobacterial pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry signals. *Photosynth. Res.* **127**, 91-102.
- Alcott, L.J., Mills, B.J.W., y Poulton, S.W. (2019). Stepwise earth oxygenation is an inherent property of global biogeochemical cycling. *Science* **366**, 1333-1337.
- Alexander, P., Avraham, U., Dalia, H., y Rakefet, S. (2003). Oxidative stress in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Various mechanisms for H₂O₂ detoxification with different physiological roles. *J. Bacteriol.* **185**, 3654-3660.
- Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L., y Aro, E.-M. (2011). Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **286**, 24007-24014.
- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L., y Aro, E.-M. (2013). Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4111-4116.
- Allahverdiyeva, Y., Isojärvi, J., Zhang, P., y Aro, E.-M. (2015). Cyanobacterial oxygenic photosynthesis is protected by flavodiiron proteins. *Life* **5**, 716-743.
- Allen, M.M. (1984). Cyanobacterial cell inclusions. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 1-25.
- Allen, M.M., Hutchison, F., y Weathers, P.J. (1980). Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J. Bacteriol.* **141**, 687-693.
- Allen, M.M., Yuen, C., Medeiros, L., Zizlsperger, N., Farooq, M., y Kolodny, N.H. (2005). Effects of light and chloramphenicol stress on incorporation of nitrogen into cyanophycin in *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1725**, 241-246.
- Anderson, S.L., y McIntosh, L. (1991). Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: A blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* **173**, 2761-2767.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., y Rodríguez-Quifones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215-237.
- Ansong, C., Sadler, N.C., Hill, E.A., Lewis, M.P., Zink, E.M., Smith, R.D., Beliaev, A.S., Konopka, A.E., y Wright, A.T. (2014). Characterization of protein redox dynamics induced during light-to-dark transitions and nutrient limitation in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 1-10.
- Apel, K., y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
- Arnér, E.S.J., y Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W., y Börnke, F. (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: Evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **22**, 1498-1515.
- Arteni, A.A., Ajlani, G., y Boekema, E.J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1787**, 272-279.
- Åslund, F., Berndt, K.D., y Holmgren, A. (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.* **272**, 30780-30786.
- Astier, J., Gross, I., y Durner, J. (2017). Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* **69**, 3401-3411.
- Atkinson, D.E. (1968). The energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter. *Biochemistry* **7**, 4030-4034.
- Badger, M.R., y Price, G.D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* **54**, 609-622.
- Baier, K., Nicklisch, S., Grundner, C., Reinecke, J., y Lockau, W. (2001). Expression of two nblA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**, 35-39.
- Bailey, S., y Grossman, A. (2008). Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1410-1420.
- Balmer, Y., y Buchanan, B.B. (2002). Yet another plant thioredoxin. *Trends Plant Sci.* **7**, 191-193.
- Balsera, M., Uberegui, E., Susanti, D., Schmitz, R.A., Mukhopadhyay, B., Schürmann, P., y Buchanan, B.B. (2013). Ferredoxin:thioredoxin reductase (FTR) links the regulation of oxygenic photosynthesis to deeply rooted bacteria. *Planta* **237**, 619-635.
- Bao, H., Melnicki, M.R., Pawlowski, E.G., Sutter, M., Agostoni, M., Lechno-Yossef, S., Cai, F., Montgomery, B.L., y Kerfeld, C.A. (2017). Additional families of orange carotenoid proteins in the



BIBLIOGRAFÍA

- photoprotective system of cyanobacteria. *Nat. Plants* 3, 17089.
- Barnett, J.P., Millard, A., Ksibe, A.Z., Scanlan, D.J., Schmid, R., y Blindauer, C.A. (2012). Mining genomes of marine cyanobacteria for elements of zinc homeostasis. *Front. Microbiol.* 3, 1-21.
- Battchikova, N., Eisenhut, M., y Aro, E.-M. (2011). Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1807, 935-944.
- Baumann, U., y Juttner, J. (2002). Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 59, 1042-1057.
- Beck, C., Knoop, H., Axmann, I.M., y Steuer, R. (2012). The diversity of cyanobacterial metabolism: Genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* 13, 56.
- Bečková, M., Gardian, Z., Yu, J., Konik, P., Nixon, P.J., y Komenda, J. (2017). Association of Psb28 and Psb27 proteins with PSII-PSI supercomplexes upon exposure of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light. *Mol. Plant* 10, 62-72.
- Behrenfeld, M.J., Halsey, K.H., y Milligan, A.J. (2008). Evolved physiological responses of phytoplankton to their integrated growth environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 2687-2703.
- Bendall, D.S., y Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1229, 23-38.
- Berger, S., Ellersiek, U., y Steinmüller, K. (1991). Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS Lett.* 286, 129-132.
- Berry, S., Schneider, D., Vermaas, W.F.J., y Rögner, M. (2002). Electron transport routes in whole cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: The role of the cytochrome bd-type oxidase. *Biochemistry* 41, 3422-3429.
- Bersanini, L., Battchikova, N., Jokel, M., Rehman, A., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., y Aro, E.-M. (2014). Flavodiiron protein Flv2/Flv4-related photoprotective mechanism dissipates excitation pressure of PSII in cooperation with phycobilisomes in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 164, 805-818.
- Biteau, B., Labarre, J., y Toledano, M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.
- Blankenship, R.E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33, 91-111.
- Botello-Morte, L., Bes, M.T., Heras, B., Fernández-Otal, Á., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2014). 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.* 20, 1396-1406.
- Botello-Morte, L., Pellicer, S., Sein-Echaluce, V.C., Contreras, L.M., Neira, J.L., Abián, O., Velázquez-Campoy, A., Peleato, M.L., Fillat, M.F., y Bes, M.T. (2016). 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.* 24, 173-185.
- Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I., y Kirilovsky, D. (2008). Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 1344-1354.
- Boulay, C., Wilson, A., Dhaene, S., y Kirilovsky, D. (2010). Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11620-11625.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brändén, G., Gennis, R.B., y Brzezinski, P. (2006). Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 1052-1063.
- Bryant, D.A. (2003). The beauty in small things revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9647-9649.
- Bryant, D.A., y Frigaard, N.-U. (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* 14, 488-496.
- Buchanan, B.B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374.
- Buchanan, B.B., y Balmer, Y. (2005). Redox regulation: A broadening horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 187-220.
- Buchanan, B.B., Schürmann, P., Wolosiuk, R.A., y Jacquot, J.P. (2002). The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.* 73, 215-222.
- Buey, R.M., Galindo-Trigo, S., López-Maury, L., Velázquez-Campoy, A., Revuelta, J.L., Florencio, F.J., de Pereda, J.M., Schürmann, P., Buchanan, B.B., y Balsera, M. (2017b). A new member of the thioredoxin reductase family from early oxygenic photosynthetic organisms. *Mol. Plant* 10, 212-215.
- Buey, R.M., Arellano, J.B., López-Maury, L., Galindo-Trigo, S., Velázquez-Campoy, A., Revuelta, J.L., de Pereda, J.M., Florencio, F.J., Schürmann, P., Buchanan, B.B., et al. (2017a).



BIBLIOGRAFÍA

- Unprecedented pathway of reducing equivalents in a diflavin-linked disulfide oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12725-12730.
- Bulychev, A.A., Cherkashin, A.A., Muronets, E.M., y Elanskaya, I. V (2018). Photoinduction of electron transport on the acceptor side of PSI in *Synechocystis* PCC 6803 mutant deficient in flavodiiron proteins Flv1 and Flv3. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1859**, 1086-1095.
- Burnap, R.L., Hagemann, M., y Kaplan, A. (2015). Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Life (Basel, Switzerland)* **5**, 348-371.
- Cai, Y.P., y Wolk, C.P. (1990). Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* **172**, 3138-3145.
- Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustafsson, P., y Clarke, A.K. (1998). The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 364-369.
- Cano, M., Holland, S.C., Artier, J., Burnap, R.L., Ghirardi, M., Morgan, J.A., y Yu, J. (2018). Glycogen synthesis and metabolite overflow contribute to energy balancing in cyanobacteria. *Cell Rep.* **23**, 667-672.
- Casella, S., Huang, F., Mason, D., Zhao, G.Y., Johnson, G.N., Mullineaux, C.W., y Liu, L.N. (2017). Dissecting the native architecture and dynamics of cyanobacterial photosynthetic machinery. *Mol. Plant* **10**, 1434-1448.
- Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* **5**, 174-182.
- Cavalier-Smith, T. (2010). Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**, 111-132.
- Cerovic, Z.G., Bergher, M., Goulas, Y., Tosti, S., y Moya, I. (1993). Simultaneous measurement of changes in red and blue fluorescence in illuminated isolated chloroplasts and leaf pieces: the contribution of NADPH to the blue fluorescence signal. *Photosynth. Res.* **36**, 193-204.
- Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S.D., y Decottignies, P. (2015). First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J. Proteome Res.* **14**, 59-71.
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A., y Van Arkel, G.A. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet. MGG* **204**, 185-191.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R., Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., y Martin, W.F. (2016). The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5441-5446.
- Chidgey, J.W., Linhartová, M., Komenda, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Canniffe, D.P., Koník, P., Pilný, J., Hunter, C.N., y Sobotka, R. (2014). A Cyanobacterial chlorophyll synthase-HliD complex associates with the Ycf39 protein and the YidC/Alb3 insertase. *Plant Cell* **26**, 1267-1279.
- Chukhutsina, V., Bersanini, L., Aro, E.-M., y van Amerongen, H. (2015). Cyanobacterial light-harvesting phycobilisomes uncouple from photosystem I during dark-to-light transitions. *Sci. Rep.* **5**, 14193.
- Collier, J.L., Herbert, S.K., Fork, D.C., y Grossman, A.R. (1994). Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. *Photosynth. Res.* **42**, 173-183.
- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S., y Darley-Usmar, V.M. (2002). Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 489-492.
- Courteille, A., Vesa, S., Sanz-Barrio, R., Casalé, A.-C., Becuwe-Linka, N., Farran, I., Havaux, M., Rey, P., y Rumeau, D. (2013). Thioredoxin m4 controls photosynthetic alternative electron pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **161**, 508-520.
- Couturier, J., Jacquot, J.-P., y Rouhier, N. (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2539-2557.
- D'Autréaux, B., y Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813-824.
- Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J.-P., y Eklund, H. (1996). Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **264**, 1044-1057.
- Daley, S.M.E., Kappell, A.D., Carrick, M.J., y Burnap, R.L. (2012). Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α-ketoglutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One* **7**, e41286.
- Davies, B.H. (1976). Chemistry and biochemistry of plant pigments. *Carotenoids* **2**, 38-165.



BIBLIOGRAFÍA

- Davies, M.J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.* 473, 805-825.
- Deschoenmaeker, F., Mihara, S., Niwa, T., Taguchi, H., Wakabayashi, K.-I., y Hisabori, T. (2018). The absence of thioredoxin m1 and thioredoxin c in *Anabaena* sp. PCC 7120 leads to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 59, 2432-2441.
- Deschoenmaeker, F., Mihara, S., Niwa, T., Taguchi, H., Nomata, J., Wakabayashi, K.-I., y Hisabori, T. (2019). Disruption of the gene *trx-m1* impedes the growth of *Anabaena* sp. PCC 7120 under nitrogen starvation. *Plant Cell Physiol.* 60, 1504-1513.
- Dietz, K.J. (2003). Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 228, 141-193.
- Doello, S., Klotz, A., Makowka, A., Gutekunst, K., y Forchhammer, K. (2018). A specific glycogen mobilization strategy enables rapid awakening of dormant cyanobacteria from chlorosis. *Plant Physiol.* 177, 594-603.
- Dolganov, N.A., Bhaya, D., y Grossman, A.R. (1995). Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 636-640.
- Eaton-Rye, J.J., y Sobotka, R. (2017). Assembly of the photosystem II membrane-protein complex of oxygenic photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 8, 884.
- Ehira, S., y Ohmori, M. (2012). The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 287, 40433-40440.
- Eisenhut, M., Von Wobeser, E.A., Jonas, L., Schubert, H., Ibelings, B.W., Bauwe, H., Matthijs, H.C.P., y Hagemann, M. (2007). Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 144, 1946-1959.
- Ejima, K., Kawaharada, T., Inoue, S., Kojima, K., y Nishiyama, Y. (2012). A change in the sensitivity of elongation factor G to oxidation protects photosystem II from photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 586, 778-783.
- Elbahloul, Y., Krehenbrink, M., Reichelt, R., y Steinbüchel, A. (2005). Physiological conditions conducive to high cyanophycin content in biomass of *Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 858-866.
- Engelken, J., Brinkmann, H., y Adamska, I. (2010). Taxonomic distribution and origins of the extended LHC (light-harvesting complex) antenna protein superfamily. *BMC Evol. Biol.* 10, 233.
- Englund, E., Liang, F., y Lindberg, P. (2016). Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* 6, 1-12.
- Ermakova, M., Huokko, T., Richaud, P., Bersanini, L., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., Peltier, G., y Allahverdiyeva, Y. (2016). Distinguishing the roles of thylakoid respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 171, 1307-1319.
- Escolar, A., y Pe, J. (1999). Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223-6229.
- Feng, L., Sun, Y., Deng, H., Li, D., Wan, J., Wang, X., Wang, W., Liao, X., Ren, Y., y Hu, X. (2014). Structural and biochemical characterization of fructose 1,6/sedoheptulose 1,7 bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechocystis* strain 6803. *FEBS J.* 281, 916-926.
- Fernández, A., Emanuel, C., Ángel, S., Francisco, L., Ocaña-Calahorra, Alfonso, V.M., B., C.J., Aurora, B., y Emilio, G. (2016). A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant. Cell Environ.* 39, 2097-2107.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., y Falkowski, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237-240.
- Fischer, B.B., Hideg, É., y Krieger-Liszka, A. (2013). Production, Detection, and Signaling of Singlet Oxygen in Photosynthetic Organisms. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2145-2162.
- Florencio, F.J., Yee, B.C., Johnson, T.C., y Buchanan, B.B. (1988). An NADP/thioredoxin system in leaves: Purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 496-507.
- Florencio, F.J., Pérez-Pérez, M.E., López-Maury, L., Mata-Cabana, A., y Lindahl, M. (2006). The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosynth. Res.* 89, 157-171.
- Flores, E., y Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39-50.
- Flores, E., y Wolk, C.P. (1985). Identification of facultatively heterotrophic, N₂-fixing cyanobacteria



BIBLIOGRAFÍA

- able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* **162**, 1339-1341.
- Forchhammer, K., y Schwarz, R. (2019). Nitrogen chlorosis in unicellular cyanobacteria – a developmental program for surviving nitrogen deprivation. *Environ. Microbiol.* **21**, 1173-1184.
- Forchhammer, K., y Selim, K.A. (2019). Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **44**, 33-53.
- Foster, R.A., y Zehr, J.P. (2019). Diversity, genomics, and distribution of phytoplankton-cyanobacterium single-cell symbiotic associations. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 435-456.
- Fu, J., y Xu, X. (2006). The functional divergence of two glgP homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 201-209.
- Fujita, Y., Murakami, A., Aizawa, K., y Ohki, K. (1994). Short-term and long-term adaptation of the photosynthetic apparatus: Homeostatic properties of thylakoids. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer, pp. 677-692.
- García-Domínguez, M., y Florencio, F.J. (1997). Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **35**, 723-734.
- Geigenberger, P., Thormählen, I., Daloso, D.M., y Fernie, A.R. (2017). The unprecedented versatility of the plant thioredoxin system. *Trends Plant Sci.* **22**, 249-262.
- Georg, J., Kostova, G., Vuorijoki, L., Schön, V., Kadowaki, T., Huokko, T., Baumgartner, D., Müller, M., Klähn, S., Allahverdiyeva, Y., et al. (2017). Acclimation of oxygenic photosynthesis to iron starvation is controlled by the sRNA IsaR1. *Curr. Biol.* **27**, 1425-1436.e7.
- Glazer, A.N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Bioenerg.* **768**, 29-51.
- Gleason, F.K., y Holmgren, A. (1981). Isolation and characterization of thioredoxin from the cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Biol. Chem.* **256**, 8306-8309.
- González, A., Bes, M.T., Barja, F., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2010). Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1900-1914.
- González, A., Angarica, V.E., Sancho, J., y Fillat, M.F. (2014). The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120 : In silico prediction and experimental validation of novel target genes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4833-4846.
- González, A., Bes, M.T., Luisa Peleato, M., y Fillat, M.F. (2016). Expanding the role of FurA as essential global regulator in cyanobacteria. *PLoS One* **11**, 1-22.
- González, A., Bes, M.T., Luisa Peleato, M., Fillat, M.F., y Sevilla, E. (2018). The challenge of iron stress in cyanobacteria. *IntechOpen Chapter 6*, 13.
- Gorman, A.A., y Rodgers, M.A.J. (1992). New trends in photobiology: Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **14**, 159-176.
- Gotor, C., Alvarez, C., Bermúdez, M.A., Moreno, I., García, I., y Romero, L.C. (2010). Low abundance does not mean less importance in cysteine metabolism. *Plant Signal. Behav.* **5**, 1028-1030.
- Griese, M., Lange, C., y Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**, 124-131.
- Grigorieva, G., y Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 367-370.
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., y Collier, J.L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* **57**, 725-749.
- Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., y Zilliges, Y. (2012). Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **158**, 3032-3043.
- Guo, J., Nguyen, A.Y., Dai, Z., Su, D., Gaffrey, M.J., Moore, R.J., Jacobs, J.M., Monroe, M.E., Smith, R.D., y Koppelaar, D.W. (2014). Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 3270-3285.
- Gütle, D.D., Roret, T., Müller, S.J., Couturier, J., Lemaire, S.D., Hecker, A., Dhalleine, T., Buchanan, B.B., Reski, R., Einsle, O., et al. (2016). Chloroplast FBPase and SBPase are thioredoxin-linked enzymes with similar architecture but different evolutionary histories. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 6779 LP-6784.
- Gutu, A., y O'Shea, E.K. (2013). Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression. *Mol. Cell* **50**, 288-294.
- Gwizdala, M., Wilson, A., y Kirilovsky, D. (2011). In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC



6803. *Plant Cell* 23, 2631-2643.
- Hagemann, M., Kern, R., Maurino, V.G., Hanson, D.T., Weber, A.P.M., Sage, R.F., y Bauwe, H. (2016). Evolution of photorespiration from cyanobacteria to land plants, considering protein phylogenies and acquisition of carbon concentrating mechanisms. *J. Exp. Bot.* 67, 2963-2976.
- Hakkila, K., Valev, D., Antal, T., Tyystjärvi, E., y Tyystjärvi, T. (2019). Group 2 sigma factors are central regulators of oxidative stress acclimation in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 60, 436-447.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hartman, H., Syvanen, M., y Buchanan, B.B. (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Mol. Biol. Evol.* 7, 247-254.
- He, Z., Zheng, F., Wu, Y., Li, Q., Lv, J., Fu, P., y Mi, H. (2015). NDH-1L interacts with ferredoxin via the subunit NdhS in *Thermosynechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* 126, 341-349.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L., y Shoe, J.L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* 4, 2.
- Heinrikson, R.L., y Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136, 65-74.
- Hernández-Prieto, M.A., Schön, V., Georg, J., Barreira, L., Varela, J., Hess, W.R., y Futschik, M.E. (2012). Iron deprivation in *Synechocystis*: Inference of pathways, non-coding RNAs, and regulatory elements from comprehensive expression profiling. *G3 journal. Genes|Genomes|Genetics* 2, 1475-1495.
- Hill, R., y Bendall, F. (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature* 186, 136-137.
- Holland, S.C., Kappell, A.D., y Burnap, R.L. (2015). Redox changes accompanying inorganic carbon limitation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 355-363.
- Holland, S.C., Artier, J., Miller, N.T., Cano, M., Yu, J., Ghirardi, M.L., y Burnap, R.L. (2016). Impacts of genetically engineered alterations in carbon sink pathways on photosynthetic performance. *Algal Res.* 20, 87-99.
- Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The Amino Acid Sequence of the Protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* 6, 475-484.
- Holmgren, A., Söderberg, B.O., Eklund, H., y Brändén, C.I. (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2305-2309.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C., y Lillig, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375-1377.
- Horiuchi, M., Nakamura, K., Kojima, K., Nishiyama, Y., Hatakeyama, W., Hisabori, T., y Hihara, Y. (2010). The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochem. J.* 431, 135-140.
- Hosoya-Matsuda, N., Motohashi, K., Yoshimura, H., Nozaki, A., Inoue, K., Ohmori, M., y Hisabori, T. (2004). Anti-oxidative stress system in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 280, 840-846.
- Howitt, C.A., y Vermaas, W.F.J. (1998). Quinol and cytochrome oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 37, 17944-17951.
- Iijima, H., Nakaya, Y., Kuwahara, A., Hirai, M.Y., y Osanai, T. (2015). Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism. *Front. Microbiol.* 6, 326.
- Ikeuchi, M., y Tabata, S. (2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70, 73-83.
- Imlay, J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., y Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376, 660-669.
- Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., Rouhier, N., Corbier, C., Didierjean, C., y Aubry, A. (2002). Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1065-1069.
- Jacquot, J.-P., Eklund, H., Rouhier, N., y Schürmann, P. (2009). Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* 14, 336-343.
- Jansson, C., Debus, R.J., Osiewacz, H.D., Gurevitz, M., y McIntosh, L. (1987). Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: inactivation of the *psbA* gene family. *Plant Physiol.* 85, 1021-1025.
- Jeong, W., Bae, S.H., Toledano, M.B., y Rhee, S.G. (2012). Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 447-456.



BIBLIOGRAFÍA

- Jimbo, H., Yutthanasirikul, R., Nagano, T., Hisabori, T., Hihara, Y., y Nishiyama, Y. (2018). Oxidation of translation factor EF-Tu inhibits the repair of photosystem II. *Plant Physiol.* **176**, 2691-2699.
- Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., y Fedoroff, N. V. (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein α and β subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* **17**, 957-970.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., y Krauß, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909-917.
- Joshi, G.S., Zianni, M., Bobst, C.E., y Tabita, F.R. (2013). Regulatory twist and synergistic role of metabolic coinducer- and response regulator-mediated CbbR-CbbI interactions in *Rhodospseudomonas palustris* CGA010. *J. Bacteriol.* **195**, 1381-1388.
- Junge, W., y Nelson, N. (2015). ATP Synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 631-657.
- Kadowaki, T., Nishiyama, Y., Hisabori, T., y Hihara, Y. (2015). Identification of OmpR-family response regulators interacting with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* **10**, 1-21.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., et al. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpō, S., Yamada, M., y Tabata, S. (2003). Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **10**, 221-228.
- Kaplan, A. (2017). On the cradle of CCM research: discovery, development, and challenges ahead. *J. Exp. Bot.* **68**, 3785-3796.
- Kato, K., Nagao, R., Jiang, T.-Y., Ueno, Y., Yokono, M., Chan, S.K., Watanabe, M., Ikeuchi, M., Shen, J.-R., Akimoto, S., et al. (2019). Structure of a cyanobacterial photosystem I tetramer revealed by cryo-electron microscopy. *Nat. Commun.* **10**, 4929.
- Kaushik, M.S., Srivastava, M., y Mishra, A.K. (2018). Iron homeostasis in cyanobacteria (Elsevier Inc.).
- Kerfeld, C.A., y Melnicki, M.R. (2016). Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **31**, 66-75.
- Kerfeld, C.A., Heinhorst, S., y Cannon, G.C. (2010). Bacterial microcompartments. *Annu. Rev. Microbiol. Microbiol.* **64**, 391-408.
- Kim, S.G., Chung, J.-S., Sutton, R.B., Lee, J.-S., López-Maury, L., Lee, S.Y., Florencio, F.J., Lin, T., Zabet-Moghaddam, M., Wood, M.J., et al. (2012). Redox, mutagenic and structural studies of the glutaredoxin/arsenate reductase couple from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 392-403.
- Kirilovsky, D. (2015). Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. *Photosynth. Res.* **126**, 3-17.
- Kiyota, H., Hirai, M.Y., y Ikeuchi, M. (2014). NblA1/A2-dependent homeostasis of amino acid pools during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolites* **4**, 517-531.
- Klotz, A., Georg, J., Bučinská, L., Watanabe, S., Reimann, V., Januszewski, W., Sobotka, R., Jendrossek, D., Hess, W.R., y Forchhammer, K. (2016). Awakening of a dormant cyanobacterium from nitrogen chlorosis reveals a genetically determined program. *Curr. Biol.* **26**, 2862-2872.
- Klughammer, C., y Schreiber, U. (1994). An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**, 261-268.
- Klughammer, B., Baier, M., y Dietz, K.J. (1998). klughammer1998.pdf. *Physiol. Plant.* **104**, 699-706.
- Knoll, A.H. (2008). Cyanobacteria and earth history. In *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution*, p. 484.
- Knoop, H., Gründel, M., Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Lockau, W., y Steuer, R. (2013). Flux balance analysis of cyanobacterial metabolism: The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLOS Comput. Biol.* **9**, e1003081.
- Knoppová, J., Sobotka, R., Tichý, M., Yu, J., Konik, P., Halada, P., Nixon, P.J., y Komenda, J. (2014). Discovery of a chlorophyll binding protein complex involved in the early steps of photosystem II assembly in *Synechocystis*. *Plant Cell* **26**, 1200-1212.
- Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., y Kanehisa, M. (2004). Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **45**, 290-299.
- Köbler, C., Schultz, S.J., Kopp, D., Voigt, K., y Wilde, A. (2018). The role of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 homolog of the circadian clock output regulator RpaA in day-night transitions. *Mol.*



BIBLIOGRAFÍA

- Microbiol. 110, 847-861.
- Kojima, K., Oshita, M., Nanjo, Y., Kasai, K., Tozawa, Y., Hayashi, H., y Nishiyama, Y. (2007). Oxidation of elongation factor G inhibits the synthesis of the D1 protein of photosystem II. Mol. Microbiol. 65, 936-947.
- Kojima, K., Motohashi, K., Morota, T., Oshita, M., Hisabori, T., Hayashi, H., y Nishiyama, Y. (2009). Regulation of translation by the redox state of elongation factor G in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J. Biol. Chem. 284, 18685-18691.
- Komenda, J., y Sobotka, R. (2016). Cyanobacterial high-light-inducible proteins - Protectors of chlorophyll- protein synthesis and assembly. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1857, 288-295.
- Kopf, M., Klähn, S., Scholz, I., Matthiessen, J.K.F., Hess, W.R., y Voß, B. (2014). Comparative analysis of the primary transcriptome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. DNA Res. 21, 527-539.
- Korn, A., Ajlani, G., Lagoutte, B., Gall, A., y Sétif, P. (2009). Ferredoxin: NADP+ oxidoreductase association with phycocyanin modulates its properties. J. Biol. Chem. 284, 31789-31797.
- Krieger-Liszkay, A. (2004). Singlet oxygen production in photosynthesis. J. Exp. Bot. 56, 337-346.
- Krieger-Liszkay, A., Kós, P.B., y Hideg, É. (2011). Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. Physiol. Plant. 142, 17-25.
- Krynická, V., Tichý, M., Krafl, J., Yu, J., Kaňa, R., Boehm, M., Nixon, P.J., y Komenda, J. (2014). Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Mol. Microbiol. 94, 609-624.
- Krynická, V., Georg, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Hunter, C.N., Futschik, M.E., Hess, W.R., y Komenda, J. (2019). Depletion of the FtsH1/3 proteolytic complex suppresses the nutrient stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. Plant Cell 31, 2912-2928.
- Labarre, J., Chauvat, F., y Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. J. Bacteriol. 171, 3449-3457.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienerberger, J.M., Bonnard, G., y Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 14144-14149.
- Langmead, B., y Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat. Methods 9, 357.
- Latifi, A., Ruiz, M., y Zhang, C.-C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Rev. 33, 258-278.
- Laughlin, T.G., Bayne, A.N., Trempe, J.-F., Savage, D.F., y Davies, K.M. (2019). Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis. Nature 566, 411-414.
- Laugier, E., Tarrago, L., Courteille, A., Innocenti, G., Eymery, F., Rumeau, D., Issakidis-Bourguet, E., y Rey, P. (2013). Involvement of thioredoxin y2 in the preservation of leaf methionine sulfoxide reductase capacity and growth under high light. Plant. Cell Environ. 36, 670-682.
- Laurent, T.C., Moore, E.C., y Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. J. Biol. Chem. 239, 3436-3444.
- Lea-Smith, D.J., Ross, N., Zori, M., Bendall, D.S., Dennis, J.S., Scott, S.A., Smith, A.G., y Howe, C.J. (2013). Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. Plant Physiol. 162, 484-495.
- Lea-Smith, D.J., Bombelli, P., Vasudevan, R., y Howe, C.J. (2016). Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1857, 247-255.
- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., y Issakidis-Bourguet, E. (2007). Thioredoxins in chloroplasts. Curr. Genet. 51, 343-365.
- Lennon, B.W., Williams, C.H., y Ludwig, M.L. (2000). Twists in catalysis: Alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. Science 289, 1190-1194.
- Li, M., Yang, Q., Zhang, L., Li, H., Cui, Y., y Wu, Q. (2007). Identification of novel targets of cyanobacterial glutaredoxin. Arch. Biochem. Biophys. 458, 220-228.
- Li, M., Semchonok, D.A., Boekema, E.J., y Bruce, B.D. (2014). Characterization and evolution of tetrameric photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. TS-821. Plant Cell 26, 1230-1245.
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., y Pakrasi, H.B. (2006). Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Protoplasma 227, 129-138.
- Liberton, M., Page, L.E., O'Dell, W.B., O'Neill, H., Mamontov, E., Urban, V.S., y Pakrasi, H.B. (2013).



BIBLIOGRAFÍA

- Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *J. Biol. Chem.* **288**, 3632-3640.
- Lindahl, M., y Florencio, F.J. (2003). Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *100*, 16107-16112.
- Liu, H., Zhang, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., He, G., Gross, M.L., y Blankenship, R.E. (2013). Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* **342**, 1104-1107.
- López-García, P., Moreira, D., Douzery, E., Forterre, P., Zuilen, M., Claeys, P., y Prieur, D. (2006). Ancient fossil record and early evolution (ca. 3.8 to 0.5 Ga). *Earth, Moon Planets* **98**, 247-290.
- López-Maury, L., Sánchez-Riego, A.M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2009). The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **191**, 3534-3543.
- López-Maury, L., Sánchez-Riego, A., Giner-Lamia, J., Huertas, M., y Florencio, F. (2014). Metals in cyanobacteria: Analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. *Life* **4**, 865-886.
- López-Maury, L., Heredia-Martínez, L.G., y Florencio, F.J. (2018). Characterization of TrxC, an atypical thioredoxin exclusively present in cyanobacteria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **7**, 164.
- López-Redondo, M.L., Moronta, F., Salinas, P., Espinosa, J., Cantos, R., Dixon, R., Marina, A., y Contreras, A. (2010). Environmental control of phosphorylation pathways in a branched two-component system. *Mol. Microbiol.* **78**, 475-489.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **124**, 311-334.
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315-322.
- Mareš, J., Strunecký, O., Bučinská, L., y Wiedermannová, J. (2019). Evolutionary patterns of thylakoid architecture in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **10**, 1-22.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, Ne. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.
- Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., y Cassier-Chauvat, C. (2008). The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* **71**, 520-532.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin-a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245-250.
- Martin, W., Mustafa, A.-Z., Henze, K., y Schnarrenberger, C. (1996). Higher-plant chloroplast and cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase isoenzymes: origins via duplication rather than prokaryote-eukaryote divergence. *Plant Mol. Biol.* **32**, 485-491.
- Mata-Cabana, A., Florencio, F.J., y Lindahl, A.M. (2007). Membrane proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 interacting with thioredoxin. *Proteomics* **7**, 3953-3963.
- McDonald, A.E., Ivanov, A.G., Bode, R., Maxwell, D.P., Rodermel, S.R., y Hüner, N.P.A. (2011). Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 954-967.
- McFarlane, C.R., Shah, N.R., Kabasakal, B. V., Echeverria, B., Cotton, C.A.R., Bubeck, D., y Murray, J.W. (2019). Structural basis of light-induced redox regulation in the Calvin-Benson cycle in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 20984-20990.
- Van De Meene, A.M.L., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas, W.F.J., y Roberson, R.W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **184**, 259-270.
- Messineo, L. (1966). Modification of the Sakaguchi reaction: spectrophotometric determination of arginine in proteins without previous hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 534-540.
- Meyer, Y., Reichheld, J.P., y Vignols, F. (2005). Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynth. Res.* **86**, 419-433.
- Mi, H., Endo, T., Schreiber, U., Ogawa, T., y Asada, K. (1992). Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **33**, 1233-1237.
- Mi, H., Endo, T., Ogawa, T., y Asada, K. (1995). Thylakoid membrane-bound pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **36**, 661-668.



BIBLIOGRAFÍA

- Mi, H., Klughammer, C., y Schreiber, U. (2000). Light-induced dynamic changes of NADPH fluorescence in *Synechocystis* PCC 6803 and its *ndhB*-defective mutant M55. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1129-1135.
- Mihara, S., Yoshida, K., Higo, A., y Hisabori, T. (2016). Functional significance of NADPH-thioredoxin reductase C in the antioxidant defense system of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol.* **58**, 86-94.
- Mihara, S., Wakao, H., Yoshida, K., Higo, A., Sugiura, K., Tsuchiya, A., Nomata, J., Wakabayashi, K., y Hisabori, T. (2018). Thioredoxin regulates G6PDH activity by changing redox states of OpcA in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. J.* **475**, 1091-1105.
- Mihara, S., Sugiura, K., Yoshida, K., y Hisabori, T. (2019). Thioredoxin targets are regulated in heterocysts of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 in a light-independent manner. *J. Exp. Bot.*
- Mimuro, M., y Katoh, T. (1991). Carotenoids in photosynthesis: absorption, transfer and dissipation of light energy. *Pure Appl. Chem.* **63**, 123.
- Minoda, A., Weber, A.P.M., Tanaka, K., y Miyagishima, S. -y. (2010). Nucleus-independent control of the Rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol.* **154**, 1532-1540.
- Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W.R., y Muro-Pastor, A.M. (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20130-20135.
- Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A., y Capone, D.G. (2004). High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific ocean. *Nature* **430**, 1027-1031.
- Moronta-Barrios, F., Espinosa, J., y Contreras, A. (2012). In vivo features of signal transduction by the essential response regulator RpaB from *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology* **158**, 1229-1237.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., y Hisabori, T. (2001). Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11224-11229.
- Muller, E.G., y Buchanan, B.B. (1989). Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* 4008-4014.
- Müller, P., Li, X.-P., y Niyogi, K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* **125**, 1558-1566.
- Mullineaux, C.W. (2014). Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1837**, 503-511.
- Mullineaux, C.W., y Allen, J.F. (1986). The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS Lett.* **205**, 155-160.
- Mullineaux, C.W., y Allen, J.F. (1990). State 1-state 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between photosystems I and II. *Photosynth. Res.* **23**, 297-311.
- Mullineaux, C.W., y Allen, J.F. (2004). Probing the Mechanism of State Transitions in Oxygenic Photosynthesis by Chlorophyll Fluorescence Spectroscopy, Kinetics and Imaging. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, G.C. Papageorgiou, y Govindjee, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 447-461.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M., y Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**, 579-582.
- Nakamura, K., y Hihara, Y. (2006). Photon flux density-dependent gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is regulated by a small, redox-responsive, LuxR-type regulator. *J. Biol. Chem.* **281**, 36758-36766.
- Narainsamy, K., Cassier-Chauvat, C., Junot, C., y Chauvat, F. (2013). High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics* **9**, 21-32.
- Navarro, F., y Florencio, F.J. (1996). The cyanobacterial thioredoxin gene is required for both photoautotrophic and heterotrophic growth. *Plant Physiol.* **111**, 1067-1075.
- Nelson, N., y Yocum, C.F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 521-565.
- Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., Schwarz, R., Kaplan, A., Ohad, I., y Reich, Z. (2007). Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *EMBO J.* **26**, 1467-1473.



BIBLIOGRAFÍA

- Nikkanen, L., y Rintamäki, E. (2019). Chloroplast thioredoxin systems dynamically regulate photosynthesis in plants. *Biochem. J.* **476**, 1159-1172.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S.I., Inaba, M., Yokota, A., y Murata, N. (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.* **20**, 5587-5594.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H., y Murata, N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **43**, 11321-11330.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., y Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1757**, 742-749.
- Nomata, J., Maeda, M., Isu, A., Inoue, K., y Hisabori, T. (2015). Involvement of thioredoxin on the scaffold activity of NifU in heterocyst cells of the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biochem.* **158**, 253-261.
- Ogawa, T., Bao, D.H., Katoh, H., Shibata, M., Pakrasi, H.B., y Bhattacharyya-Pakrasi, M. (2002). A two-component signal transduction pathway regulates manganese homeostasis in *Synechocystis* 6803, a photosynthetic organism. *J. Biol. Chem.* **277**, 28981-28986.
- Ogawa, T., Harada, T., Ozaki, H., y Sonoike, K. (2013). Disruption of the *ndhF1* gene affects Chl fluorescence through state transition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in apparent high efficiency of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1164-1171.
- Ohkawa, H., Pakrasi, H.B., y Ogawa, T. (2000). Two types of functionally distinct NAD(P)H dehydrogenases in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Biol. Chem.* **275**, 31630-31634.
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J.M., y Cejudo, F.J. (2018). The NADPH-dependent thioredoxin reductase C-2-Cys Peroxiredoxin redox system modulates the activity of thioredoxin x in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **59**, 2155-2164.
- Okegawa, Y., y Motohashi, K. (2015). Chloroplastic thioredoxin m functions as a major regulator of Calvin cycle enzymes during photosynthesis *in vivo*. *Plant J.* **84**, 900-913.
- Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., y Maeda, S.I. (2001). Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **183**, 1891-1898.
- Papageorgiou, G.C., y Govindjee (2014). The non-photochemical quenching of the electronically excited state of chlorophyll a in plants: Definitions, timelines, viewpoints, open questions. In *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, pp. 1-44.
- Pathak, J., Ahmed, H., Singh, P.R., Singh, S.P., Häder, D.-P., y Sinha, R.P. (2019). Mechanisms of photoprotection in cyanobacteria. In *Cyanobacteria*, (Elsevier), pp. 145-171.
- Paulsen, C.E., y Carroll, K.S. (2013). Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chem. Rev.* **113**, 4633-4679.
- Peltier, G., Aro, E.-M., y Shikanai, T. (2016). NDH-1 and NDH-2 Plastoquinone Reductases in Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 55-80.
- Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., y Lindahl, M. (2006). Selecting thioredoxins for disulphide proteomics: Target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **6**, S186-S195.
- Pérez-Pérez, M.E., Martín-Figueroa, E., y Florencio, F.J. (2009a). Photosynthetic regulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 thioredoxin system and functional analysis of TrxB (Trx x) and TrxQ (Trx y) thioredoxins. *Mol. Plant* **2**, 270-283.
- Pérez-Pérez, M.E., Mata-Cabana, A., Sánchez-Riego, A.M., Lindahl, M., y Florencio, F.J. (2009b). A comprehensive analysis of the peroxiredoxin reduction system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 reveals that all five peroxiredoxins are thioredoxin dependent. *J. Bacteriol.* **191**, 7477-7489.
- Pérez-Pérez, M.E., Couso, I., y Crespo, J.L. (2012). Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **8**, 376-388.
- Pérez-Pérez, M.E., Mauriès, A., Maes, A., Tourasse, N.J., Hamon, M., Lemaire, S.D., y Marchand, C.H. (2017). The deep thioredoxome in *Chlamydomonas reinhardtii*: New insights into redox regulation. *Mol. Plant* **10**, 1107-1125.
- Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., y Cejudo, F.J. (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**, 2356-2368.
- Pérez-Ruiz, J.M., Naranjo, B., Ojeda, V., Guinea, M., y Cejudo, F.J. (2017). NTRC-dependent redox balance of 2-Cys peroxiredoxins is needed for optimal function of the photosynthetic apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12069-12074.



BIBLIOGRAFÍA

- Piechura, J.R., Amarnath, K., y O'Shea, E.K. (2017). Natural changes in light interact with circadian regulation at promoters to control gene expression in cyanobacteria. *Elife* 6, 1-40.
- Poole, L.B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 80, 148-157.
- Poole, L.B., y Nelson, K.J. (2008). Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 18-24.
- Poole, L.B., Karplus, P.A., y Claiborne, A. (2004). Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 325-347.
- Porter, R.D. (1986). Transformation in cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 13, 111-132.
- Price, G.D. (2011). Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth. Res.* 109, 47-57.
- Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., y Long, B.M. (2007). Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.* 59, 1441-1461.
- Pucciariello, C., y Perata, P. (2017). New insights into reactive oxygen species and nitric oxide signalling under low oxygen in plants. *Plant. Cell Environ.* 40, 473-482.
- Pulido, P., Spínola, M.C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M.B., Sahrawy, M., Sandalio, L.M., Dietz, K.-J., González, M., y Cejudo, F.J. (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 61, 4043-4054.
- Puszynska, A.M., y O'Shea, E.K. (2017). Switching of metabolic programs in response to light availability is an essential function of the cyanobacterial circadian output pathway. *Elife* 6, 1-18.
- Raines, C.A. (2003). The Calvin cycle revisited. *Photosynth. Res.* 75, 1-10.
- Reichheld, J.-P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G., y Meyer, Y. (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579, 337-342.
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A., y Thomas, J.-C. (2001). Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nbIA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183, 2989-2994.
- Riediger, M., Hihara, Y., y Hess, W.R. (2018). From cyanobacteria and algae to land plants: The RpaB/Ycf27 regulatory network in transition. *Perspect. Phycol.* 5, 13-25.
- Riediger, M., Kadowaki, T., Nagayama, R., Georg, J., Hihara, Y., y Hess, W.R. (2019). Biocomputational analyses and experimental validation identify the regulon controlled by the redox-responsive transcription factor RpaB. *iScience* 15, 316-331.
- Rippka, R. (1972). Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 87, 93-98.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., y Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111, 1-61.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., y Lang, B.F. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.* 15, 1325-1330.
- Sadler, N.C., Melnicki, M.R., Serres, M.H., Merkley, E.D., Chrisler, W.B., Hill, E.A., Romine, M.F., Kim, S., Zink, E.M., Datta, S., et al. (2014). Live cell chemical profiling of temporal redox dynamics in a photoautotrophic cyanobacterium. *ACS Chem. Biol.* 9, 291-300.
- Saha, R., Liu, D., Connor, A.H., Liberton, M., Yu, J., y Bhattacharyya-pakrasi, M. (2016). Diurnal regulation of cellular processes in the cyanobacterium. *MBio* 7, 1-14.
- Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., y Meyer, Y. (1996). Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.* 42, 422-431.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.
- Sánchez-Riego, A.M., López-Maury, L., y Florencio, F.J. (2013). Glutaredoxins are essential for stress adaptation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Plant Sci.* 4, 428.
- Sánchez-Riego, A.M., López-Maury, L., y Florencio, F.J. (2014). Genomic responses to arsenic in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* e96826.
- Sánchez-Riego, A.M., Mata-Cabana, A., Galmozzi, C. V., y Florencio, F.J. (2016). NADPH-thioredoxin reductase C mediates the response to oxidative stress and thermotolerance in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Front. Microbiol.* 7, 1283.
- Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Völker, U., y Forchhammer, K. (2001). Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. low-level photosynthesis as a mechanism of long-term survival. *Plant Physiol.* 126, 233 LP-243.
- Schägger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T.A., y Von Jagow, G. (1987). Isolation and amino



BIBLIOGRAFÍA

- acid sequence of the 'Rieske' iron sulfur protein of beef heart ubiquinol: cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* **219**, 161-168.
- Schamel, W.W.A. (2008). Two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Curr. Protoc. cell Biol.* **38**, 6-10.
- Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., y Sherman, L.A. (1994). Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* **176**, 1586-1597.
- Schneider, D., Berry, S., Volkmer, T., Seidler, A., y Rögner, M. (2004). PetC1 is the major Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome b₆f complex of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **279**, 39383-39388.
- Schopf, J.W. (1993). Microfossils of the early archaean apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* **260**, 640-646.
- Schopf, J.W. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **107**, 87-101.
- Schreiber, U., y Klughammer, C. (2009). New NADPH/9-AA module for the DUAL-PAM-100: description, operation and examples of application. *PAM Appl. notes* **2**, 1-13.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi, H., y Asada, K. (1995). Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **36**, 873-882.
- Schürmann, P., y Buchanan, B.B. (2008). The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1235-1274.
- Schürmann, P., y Jacquot, J.-P. (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 371-400.
- Schwarz, D., Schubert, H., Georg, J., Hess, W.R., y Hagemann, M. (2013). The gene *sml0013* of *Synechocystis* species strain PCC 6803 encodes for a novel subunit of the NAD(P)H oxidoreductase or complex I that is ubiquitously distributed among cyanobacteria. *Plant Physiol.* **163**, 1191-1202.
- Serrato, A.J., Pérez-Ruiz, J.M., Spínola, M.C., y Cejudo, F.J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 43821-43827.
- Shen, J.-R. (2015). The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 23-48.
- Shikanai, T., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y., Asada, K., y Yokota, A. (1998). Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9705-9709.
- Shimakawa, G., y Miyake, C. (2018). Respiratory terminal oxidases alleviate photo-oxidative damage in photosystem I during repetitive short-pulse illumination in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* **137**, 241-250.
- Shimakawa, G., Shaku, K., Nishi, A., Hayashi, R., Yamamoto, H., Sakamoto, K., Makino, A., y Miyake, C. (2015). FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol.* **167**, 472-480.
- Shimakawa, G., Shaku, K., y Miyake, C. (2016). Oxidation of P700 in photosystem I is essential for the growth of cyanobacteria. *Plant Physiol.* **172**, 1443-1450.
- Shimakawa, G., Shaku, K., y Miyake, C. (2018). Reduction-induced suppression of electron flow (RISE) is relieved by non-ATP-consuming electron flow in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Front. Microbiol.* **9**, 886.
- Shinde, S., Zhang, X., Singapuri, S.P., Kalra, I., Liu, X., Morgan-Kiss, R.M., y Wang, X. (2020). Glycogen metabolism supports photosynthesis start through the oxidative pentose phosphate pathway in cyanobacteria. *Plant Physiol.* **182**, 507 LP-517.
- Shoumskaya, M.A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D.A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., y Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 21531-21538.
- Siegelman, H.W., y Kycia, J.H. (1978). Algal biliproteins. In *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. pp. 71-79.
- Simon, W.J., Hall, J.J., Suzuki, I., Murata, N., y Slabas, A.R. (2002). Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **2**, 1735-1742.
- Singh, S.P., y Montgomery, B.L. (2011). Determining cell shape: Adaptive regulation of



BIBLIOGRAFÍA

- cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends Microbiol.* **19**, 278-285.
- Soo, R.M., Hemp, J., Parks, D.H., Fischer, W.W., y Hugenholtz, P. (2017). On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in cyanobacteria. *Science* **355**, 1436-1440.
- Stadnichuk, I.N., Krasilnikov, P.M., y Zlenko, D. V (2015). Cyanobacterial phycobilisomes and phycobiliproteins. *Microbiology* **84**, 101-111.
- Staleva, H., Komenda, J., Shukla, M.K., Šlouf, V., Kaňa, R., Polívka, T., y Sobotka, R. (2015). Mechanism of photoprotection in the cyanobacterial ancestor of plant antenna proteins. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 287.
- Stanier, R.Y., y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 225-274.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., y Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**, 171-205.
- Steinhauser, D., Fernie, A.R., y Araújo, W.L. (2012). Unusual cyanobacterial TCA cycles: Not broken just different. *Trends Plant Sci.* **17**, 503-509.
- Stork, T., Michel, K.P., Pistorius, E.K., y Dietz, K.J. (2005). Bioinformatic analysis of the genomes of the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for the presence of peroxiredoxins and their transcript regulation under stress. *J. Exp. Bot.* **56**, 3193-3206.
- Strand, D.D., Fisher, N., y Kramer, D.M. (2017). The higher plant plastid NAD(P)H dehydrogenase-like complex (NDH) is a high efficiency proton pump that increases ATP production by cyclic electron flow. *J. Biol. Chem.* **292**, 11850-11860.
- Sun, Q.-A., Kirnarsky, L., Sherman, S., y Gladyshev, V.N. (2001). Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3673-3678.
- Sutter, M., Wilson, A., Leverenz, R.L., Lopez-Igual, R., Thurotte, A., Salmeen, A.E., Kirilovsky, D., y Kerfeld, C.A. (2013). Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10022-10027.
- Takahashi, S., y Murata, N. (2005). Interruption of the Calvin cycle inhibits the repair of photosystem II from photodamage. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* **1708**, 352-361.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., y Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 157-184.
- Takahashi, H., Kusama, Y., Li, X., Takaichi, S., y Nishiyama, Y. (2018). Overexpression of orange carotenoid protein protects the repair of PSII under strong light in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **60**, 367-375.
- Tamoi, M., Takeda, T., y Shigeoka, S. (1999). Functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase isozymes (fbp-I and fbp-II gene products) in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **40**, 257-261.
- Teuber, M., Rögner, M., y Berry, S. (2001). Fluorescent probes for non-invasive bioenergetic studies of whole cyanobacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1506**, 31-46.
- Thelwell, C., Robinson, N.J., y Turner-Cavet, J.S. (1998). An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10728-10733.
- Thiel, T., y Poo, H. (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**, 5743-5746.
- Thomas, J.-C., Ughy, B., Lagoutte, B., y Ajlani, G. (2006). A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18368-18373.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., y Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562-578.
- Vavilin, D., Brune, D.C., y Vermaas, W. (2005). 15N-labeling to determine chlorophyll synthesis and degradation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains lacking one or both photosystems. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1708**, 91-101.
- Vavitsas, K., Rue, E.Ø., Stefánsdóttir, L.K., Gnanasekaran, T., Blennow, A., Crocoll, C., Gudmundsson, S., y Jensen, P.E. (2017). Responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to heterologous biosynthetic pathways. *Microb. Cell Fact.* **16**, 140.
- Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A., y Teixeira, M. (2002). Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 82-87.
- Vioque, A. (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6331-6337.



BIBLIOGRAFÍA

- Vlamiš-Gardikas, A., y Holmgren, A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol.* **347**, 286-296.
- Walters, E.M., García-Serres, R., Jameson, G.N.L., Glauser, D.A., Bourquin, F., Manieri, W., Schürmann, P., Johnson, M.K., y Huynh, B.H. (2005). Spectroscopic characterization of site-specific [Fe4S4] Cluster chemistry in Ferredoxin:Thioredoxin reductase: Implications for the catalytic mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9612-9624.
- Wan, N., DeLorenzo, D.M., He, L., You, L., Immethun, C.M., Wang, G., Baidoo, E.E.K., Hollinshead, W., Keasling, J.D., Moon, T.S., et al. (2017). Cyanobacterial carbon metabolism: Fluxome plasticity and oxygen dependence. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1593-1602.
- Wang, P., Liu, J., Liu, B., Feng, D., Da, Q., Shu, S., Su, J., Zhang, Y., Wang, J., y Wang, H.-B. (2013). Evidence for a role of chloroplastic m-type thioredoxins in the biogenesis of photosystem II in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163**, 1710-1728.
- Wang, W.-H., He, E.-M., Chen, J., Guo, Y., Chen, J., Liu, X., y Zheng, H.-L. (2016). The reduced state of the plastoquinone pool is required for chloroplast-mediated stomatal closure in response to calcium stimulation. *Plant J.* **86**, 132-144.
- Watzer, B., Engelbrecht, A., Hauf, W., Stahl, M., Maldener, I., y Forchhammer, K. (2015). Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII. *Microb. Cell Fact.* **14**, 1-12.
- Westall, F. (2006). Early life on earth: The ancient fossil record. *Astrobiol. Futur. Perspect.* 287-316.
- Whitney, S.M., Houtz, R.L., y Alonso, H. (2011). Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol.* **155**, 27-35.
- Whitton, B.A. (2012). *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time* (Springer Science & Business Media).
- Wilde, A., y Hihara, Y. (2016). Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyanobacterial photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857**, 296-308.
- Wilson, A., Ajlani, G., Verbavatz, J.-M., Vass, I., Kerfeld, C.A., y Kirilovsky, D. (2006). A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* **18**, 992-1007.
- Wilson, A., Boulay, C., Wilde, A., Kerfeld, C.A., y Kirilovsky, D. (2007). Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA proteins. *Plant Cell* **19**, 656-672.
- Wolk, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P., y Elhai, J. (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1561-1565.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., y Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 32-40.
- Xu, M., Lv, J., Fu, P., y Mi, H. (2016). Oscillation kinetics of post-illumination increase in Chl fluorescence in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Front. Plant Sci.* **7**, 1-7.
- Xu, Y., Guerra, L.T., Li, Z., Ludwig, M., Dismukes, G.C., y Bryant, D.A. (2013). Altered carbohydrate metabolism in glycogen synthase mutants of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: cell factories for soluble sugars. *Metab. Eng.* **16**, 56-67.
- Yagi, Y., y Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Front. Plant Sci.* **5**, 1-7.
- Yamaguchi, K., Suzuki, I., Yamamoto, H., Lyukevich, A., Bodrova, I., Los, D.A., Piven, I., Zinchenko, V., Kanehisa, M., y Murata, N. (2002). A two-component Mn²⁺-sensing system negatively regulates expression of the mntCAB operon in *Synechocystis*. *Plant Cell* **14**, 2901-2913.
- Yamori, W., y Shikanai, T. (2016). Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 81-106.
- Yan, C., y Xu, X. (2008). Bifunctional enzyme FBpase/SBPase is essential for photoautotrophic growth in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Prog. Nat. Sci.* **18**, 149-153.
- Yao, D., Kieselbach, T., Komenda, J., Promnares, K., Prieto, M.A.H., Tichy, M., Vermaas, W., y Funk, C. (2007). Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II. *J. Biol. Chem.* **282**, 267-276.
- Yee, B.C., de la Torre, A., Crawford, N.A., Lara, C., Carlson, D.E., y Buchanan, B.B. (1981). The ferredoxin/thioredoxin system of enzyme regulation in a cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* **130**, 14-18.
- Yoo, S.-H., Lee, B.-H., Moon, Y., Spalding, M.H., y Jane, J. (2014). Glycogen synthase isoforms in *Synechocystis* sp. PCC6803: Identification of different roles to produce glycogen by targeted mutagenesis. *PLoS One* **9**, e91524.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., y Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 809-818.
- Yoshida, K., y Hisabori, T. (2016). Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast



BIBLIOGRAFÍA

- functions and sustain plant viability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E3967-E3976.
- Yu, A., Xie, Y., Pan, X., Zhang, H., Cao, P., Su, X., Chang, W., y Li, M. (2020). Photosynthetic phosphoribulokinase structures: Enzymatic mechanisms and the redox regulation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. *Plant Cell*.
- Yutthanasirikul, R., Nagano, T., Jimbo, H., Hihara, Y., Kanamori, T., Ueda, T., Haruyama, T., Konno, H., Yoshida, K., Hisabori, T., et al. (2016). Oxidation of a cysteine residue in elongation factor EF-Tu reversibly inhibits translation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 291, 5860-5870.
- Zaffagnini, M., Fermani, S., Marchand, C.H., Costa, A., Sparla, F., Rouhier, N., Geigenberger, P., Lemaire, S.D., y Trost, P. (2018). Redox homeostasis in photosynthetic organisms: Novel and established thiol-based molecular mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* 31:3, 155-210.
- Zhang, S., y Bryant, D.A. (2011). The Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria. *Science* 334, 1551-1553.
- Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M., y Aro, E.-M. (2009). Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4.
- Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T.A., y Aro, E.-M. (2012). Operon flv4-flv2 provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *Plant Cell* 24, 1952-1971.
- Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G.C., y Bryant, D.A. (2016). Natural and synthetic variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in cyanobacteria: introduction of the GABA shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front. Microbiol.* 7, 1972.

