



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Redes de regulación global mediadas por proteínas FUR
en *Anabaena* sp. PCC7120

Global regulatory networks performed by FUR proteins
in *Anabaena* sp. PCC7120

Autora

Ainhoa Riera Begué

Directores

Emma Sevilla Miguel

Jorge Guío Martínez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias
2021



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

Emma Sevilla Miguel y Jorge Guío Martínez

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “Redes de regulación global mediadas por proteínas FUR en *Anabaena* PCC7120” presentada por Ainhoa Riera Begué ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

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

Zaragoza a 25 de junio de 2021

Emma Sevilla Miguel

Jorge Guío Martínez

Agradecimientos

Me gustaría transmitir mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en este proyecto.

En primer lugar, a mis directores: a Emma Sevilla por ofrecerme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado, por guiarme y aconsejarme; y a Jorge Guío por orientarme y enseñarme tanto durante todo este año, y sobre todo por su eterna paciencia en el laboratorio.

A Germán, mi compañero de laboratorio, por haber hecho esta experiencia mucho más divertida. Así como a Cris por su ayuda en múltiples ocasiones.

A María Fillat y Marisa Peleato por ser una referencia e inspiración para seguir el camino de la investigación.

Por último, a mi familia por su apoyo incondicional, y en especial a mi yayo porque sé que estaría muy orgulloso de su nieta biotecnóloga.

Índice

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Las cianobacterias	2
2.2. Estrés abióticos en cianobacterias	2
2.2.1. Deficiencia de metales	2
2.2.2. Estrés oxidativo	2
2.2.3. Deficiencia de nitrógeno	3
2.3. Regulación de la expresión génica	3
2.3.1. Sistemas de dos componentes	3
2.3.2. Reguladores transcripcionales	4
2.4. Las proteínas FUR en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	4
2.4.1. FurA	4
2.4.2. FurB	5
2.4.3. FurC	6
2.4.4. Evidencia de la existencia de redes de regulación integradas por proteínas FUR en <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	6
3. Objetivos	6
4. Materiales y métodos	7
4.1. Técnicas de trabajo con DNA	7
4.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	7
4.1.2. Electroforesis de DNA	7
4.1.3. Purificación y cuantificación de los productos de PCR	7
4.2. Técnicas de trabajo con RNA	7
4.2.1. Retrotranscripción	8
4.2.2. Estudios de expresión génica mediante Real Time RT-PCR	8
4.3. Purificación de proteínas	8
4.3.1. Lisis celular	8
4.3.2. Purificación de FurC	8
4.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes	9
4.4. Ensayos de retador en gel (EMSA)	10
4.5. Técnicas bioinformáticas	10

5. Resultados	11
5.1. Estudio de unión de las proteínas FUR a promotores de genes con funciones reguladoras	11
5.1.1. Estudio de la unión de FurA a promotores de genes con funciones reguladoras	11
5.1.2. Estudio de la unión de FurB a promotores de genes con funciones reguladoras	12
5.1.3. Estudio de la unión de FurC a promotores de genes con funciones reguladoras	14
5.2. Cross-regulación entre los tres parálogos FUR de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	15
5.3. Análisis por Real Time RT-PCR de cambios en la expresión de una selección de genes directamente regulados por FurC en respuesta a deficiencia de nitrógeno y estrés oxidativo	17
6. Discusión	19
6.1. Red de regulación mediada por FurA	19
6.2. Red de regulación mediada por FurB	20
6.3. Red de regulación mediada por FurC	21
6.4. FurC responde a las señales de estrés oxidativo y de deficiencia de nitrógeno de manera independiente	22
7. Conclusiones/Conclusions	23
8. Bibliografía	24

Abreviaturas

2-OG: 2-Oxoglutarato

ABC: ATP-Binding Casette

ANOVA: ANalysis Of VAriance (Análisis de varianza)

cAMP: Adenosin Monofosfato Cíclico

cGMP: Guanosin Monofosfato Cíclico

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

DEAE: Dietil-aminoetil

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

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

FUR: Ferric Uptake Regulator

HTH: Helix-Turn-Helix (hélice-giro-hélice)

Irr: Iron Responsive Regulator

Mur: Manganese Uptake Regulator

Nur: Nickel Uptake Regulator

PCR: Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PerR: Peroxide Stress Regulator

PSA: Persulfato de Amonio

ROS: Reactive Oxygen Species

RT-PCR: Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electrophoresis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)

SOD: Superóxido Dismutasa

TEMED: Tetrametiletildiamina

Tm: Melting Temperature

Zur: Zinc Uptake Regulator

1. Resumen / Abstract

1.1. Resumen

Las cianobacterias son organismos muy ubicuos que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el planeta, ocupando ambientes muy diversos en los que deben enfrentarse a diferentes estreses abióticos. Uno de los principales mecanismos que permite a las cianobacterias adaptarse a estos estreses es la regulación de la expresión génica, que principalmente es llevada a cabo por reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes. En la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 una de las familias de reguladores transcripcionales más importantes es la familia FUR, compuesta por tres parálogos denominados FurA, FurB y FurC. Estos tres factores de transcripción son esenciales para orquestar las respuestas de esta cianobacteria a estreses abióticos y son reguladores globales que modulan la expresión de una gran número de genes en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120. Algunos de estos genes están regulados de forma directa pero muchos otros están regulados indirectamente a través de reguladores transcripcionales o sistemas de dos componentes que se encuentran jerárquicamente por debajo de estas proteínas.

En este trabajo, con el objetivo de identificar redes de regulación global mediadas por proteínas FUR, se ha analizado la capacidad de FurA, FurB y FurC de regular de forma directa genes de reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes mediante ensayos de retardo en gel (EMSA). Además, también se ha estudiado transcripcionalmente la respuesta a la deficiencia de nitrógeno y al estrés oxidativo de algunas proteínas con funciones reguladoras controladas por FurC. Así, se han identificado redes de regulación transcripcional mediadas por proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCC7120 que podrían jugar un papel clave en la respuesta de esta cianobacteria a los estreses abióticos.

1.2. Abstract

Cyanobacteria are very ubiquitous organisms widely spread throughout the world, occupying very diverse environments in which they must face different abiotic stresses. One of the main mechanisms that makes it possible for cyanobacteria to adapt to these stresses is the regulation of gene expression, mainly carried out by transcriptional regulators and two-component systems. In the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 one of the most important families of transcriptional is FUR family, composed of three paralogs denominated FurA, FurB and FurC. These three transcriptional factors are essential to orchestrate the responses of this cyanobacteria to abiotic stresses, and they are global regulators that modulate the expression of a great number of genes in the *Anabaena* sp. PCC7120 genome. Some of these genes are directly regulated, however, many others are regulated indirectly by transcriptional regulators and two-component systems that are hierarchically below.

In this work, in order to identify global regulatory networks performed by FUR proteins, the ability of FurA, FurB and FurC to directly regulate genes of transcriptional regulators and two-component systems has been analysed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Furthermore, the response to nitrogen deficiency and oxidative stress of some proteins with regulatory functions controlled by FurC has also been transcriptionally studied. Thus transcriptional regulation networks performed by FUR proteins in *Anabaena* sp. PCC7120 that could play a key role in its response to abiotic stresses have been identified.

2. Introducción

2.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo muy diverso de procariotas fotosintéticos oxigénicos Gram negativos. Son considerados los ancestros evolutivos de los cloroplastos y los responsables de la oxigenación de la atmósfera (1), puesto que fueron los primeros organismos capaces de usar el agua como donador de electrones, resultando en la liberación de oxígeno. Por este motivo, las cianobacterias fueron indispensables en el desarrollo de la vida en la superficie terrestre.

Estos organismos desempeñan un papel esencial en los ciclos biogeoquímicos, participando en el suministro de oxígeno, la fijación de CO₂, producción primaria de biomasa y, algunas cepas, en la fijación de nitrógeno atmosférico (2). Sin embargo, su proliferación descontrolada da lugar a lo que se conoce como *blooms*, que pueden ocasionar un desbalance de la biodiversidad del ecosistema. Además algunas especies producen cianotoxinas y pueden suponer un problema para la salud (3).

Las cianobacterias están ampliamente distribuidas, ocupando casi todos los hábitats acuáticos y terrestres del planeta, desde océanos hasta desiertos pasando por regiones polares (1). El éxito en la colonización de esta enorme variedad de nichos ecológicos se debe a su capacidad para hacer frente a diversas condiciones de estrés (4).

2.2. Estréses abióticos en cianobacterias

Los ambientes que habitan las cianobacterias presentan diversos estréses abióticos a los que tienen que adaptarse, como son la deficiencia de metales, la deficiencia de nitrógeno y el estrés oxidativo.

2.2.1. Deficiencia de metales

Es muy común que las cianobacterias se enfrenten tanto a situaciones de exceso como de deficiencia de metales, que en ambos casos comprometen el crecimiento celular. Por ello, es esencial la existencia de mecanismos que permitan regular de forma precisa la homeostasis de metales, lo que requiere complejos sistemas de señalización (5).

El zinc, al tener diversas funciones como elemento estructural, cofactor enzimático o manteniendo la conformación de determinados dominios proteicos, es uno de los metales divalentes más importantes (5). Las cianobacterias son muy dependientes de este metal, ya que contienen varias metaloproteínas dependientes de zinc como la anhidrasa carbónica, encargada de la fijación de CO₂ (5). Además, la concentración de zinc está relacionada con el mantenimiento del estado redox intracelular, de modo que su control es necesario para evitar el estrés oxidativo (6). Este control de la homeostasis del zinc es llevado a cabo por reguladores transcripcionales de diferentes familias, destacando los reguladores Zur (Zinc uptake regulator) pertenecientes a la familia FUR (5).

Por otra parte, el hierro tiene un papel esencial como cofactor en proteínas implicadas en los principales procesos biológicos, como la fotosíntesis o fijación de nitrógeno (4). La deficiencia de este metal es muy común debido a su baja solubilidad. En la mayoría de bacterias, la homeostasis de hierro está mediada por la proteína Fur (Ferric uptake regulator), el principal regulador transcripcional de los genes relacionados con el mantenimiento de su concentración intracelular (4).

2.2.2. Estrés oxidativo

Como consecuencia del metabolismo aeróbico y el transporte electrónico fotosintético se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), potentes agentes oxidantes como el peróxido o el superóxido que reaccionan con las biomoléculas produciendo daño oxidativo (7). Cuando la cantidad de ROS sobrepasa la de moléculas antioxidantes se produce un desbalance denominado estrés oxidativo (8).

En cianobacterias estas ROS aparecen principalmente cuando la intensidad de la luz recibida por los fotosistemas es mayor que la tasa de consumo electrónica, produciendo fotoinhibición (7). Debido a las condiciones cambiantes de intensidad de luz a las que se exponen las cianobacterias, es esencial para su supervivencia el desarrollo de sistemas de defensa que eliminen o reduzcan estas ROS antes de que produzcan efectos perjudiciales (4, 7). Existen por ello defensas enzimáticas, como superóxido dismutasas (SOD), catalasas y peroxidasas, y defensas no enzimáticas, como los carotenoides (7). La respuesta al estrés oxidativo viene mediada por la acción coordinada de reguladores transcripcionales que modulan la expresión de una serie de genes relacionados con la síntesis de enzimas antioxidantes o de reparación del daño oxidativo. En cianobacterias el sistema de dos componentes PrqR/CalA y el regulador PerR (Peroxide Stress Regulator) son considerados los principales reguladores de respuesta a superóxido y peróxido, respectivamente (9).

2.2.3. Deficiencia de nitrógeno

La deficiencia de nutrientes suele ser un factor limitante en el crecimiento de las cianobacterias, siendo la más habitual la deficiencia de nitrógeno (4). Las cianobacterias pueden sobrevivir un gran lapso de tiempo en deficiencia de nitrógeno disminuyendo su metabolismo central y degradando su maquinaria fotosintética, dando lugar a un fenómeno denominado clorosis (10).

No obstante, la falta de este nutriente realmente solo constituye un estrés para las cianobacterias no diazotróficas, puesto que las diazotróficas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (10), proceso que en algunas especies de cianobacterias filamentosas tiene lugar en células especializadas denominadas heterocistos. La formación de heterocistos a partir de células vegetativas es posible gracias a una serie de cambios morfológicos y metabólicos encaminados a generar un ambiente anaerobio en el que pueda funcionar la nitrogenasa, enzima responsable de la fijación de nitrógeno, pues es sensible al oxígeno (11).

Las principales fuentes de nitrógeno de las cianobacterias se presentan en forma de nitrógeno combinado, especialmente amonio, el cual es incorporado al 2-oxoglutarato (2-OG) dando lugar a glutamato. Por ello la acumulación de 2-OG sirve como señalizador molecular de la deficiencia de nitrógeno tanto en cianobacterias diazotróficas como no diazotróficas (12). Uno de los principales sensores del 2-OG en cianobacterias es el regulador transcripcional NtcA, cuya actividad de unión al DNA está modulada alostéricamente por los niveles de 2-OG (12). En respuesta a este metabolito NtcA es capaz de activar el proceso de diferenciación de heterocistos y la expresión de genes esenciales para la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno como el nitrato o la urea.

2.3. Regulación de la expresión génica en cianobacterias

Los estreses abióticos afectan a la homeostasis celular de las cianobacterias, las cuales han desarrollado diversas estrategias para adaptarse a estos estreses y sobrevivir como la modificación de la expresión génica. Los principales mecanismos de regulación génica en cianobacterias, aunque no los únicos, son los sistemas de dos componentes y los reguladores transcripcionales (4).

2.3.1. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son una familia de proteínas de transducción de señales presentes en todos los dominios, no solo en bacterias, sino también en algunos eucariotas, aunque son más abundantes en los primeros (13). Son un mecanismo de acoplamiento estímulo-respuesta que permite a los organismos detectar y adaptarse a cambios y estreses ambientales (13).

La estructura canónica de un sistema de dos componentes consta de dos partes: una proteína sensora, correspondiente a una histidina quinasa, y un regulador de respuesta; aunque también hay sistemas híbridos que contienen los dominios sensor y regulador unidos en un único polipéptido (14, 15). Cuando la histidina quinasa recibe una señal externa se autofosforila en un residuo conservado de histidina, este grupo fosfato se transfiere a un residuo de aspartato del regulador de respuesta, y como consecuencia cambia su actividad, resultando en una modificación del comportamiento celular o la expresión de genes (14).

Además de estos sistemas de dos componentes, también existen otros sensores y transductores de señal cuya actividad catalítica es similar, como las serin/treonin/tirosin quinastas.

2.3.2. Reguladores transcripcionales

Los reguladores transcripcionales son proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA para modular la expresión de sus genes diana. Normalmente consisten en proteínas de dos dominios, uno que recibe la señal y otro de unión a DNA, siendo el más común hélice giro hélice (HTH) (16). Cabe destacar una superfamilia de reguladores transcripcionales, FUR (ferric uptake regulator), presente en la mayoría de procariontes, que juega un papel fundamental en la regulación de las principales rutas metabólicas en cianobacterias (6). Dentro de cada organismo pueden coexistir varias proteínas de esta superfamilia que desempeñan distintas funciones. Los miembros más ubicuos son Fur, regulador global que da nombre a la familia, Zur que juega un papel fundamental en la homeostasis del zinc, y PerR esencial en la respuesta al estrés oxidativo (6). Otros miembros de la familia FUR son Nur (implicado en la homeostasis del níquel), Mur (implicado en la homeostasis de manganeso) e Irr (un regulador de respuesta a hierro dependiente de hemo) (6).

2.4. Las proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCCC 7120

Los reguladores transcripcionales de la familia FUR son metaloproteínas que contienen un dominio de unión a DNA hélice-giro-hélice en el extremo N-terminal y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal (6). Se unen a secuencias ricas en A/T presentes en los promotores de los genes diana utilizando como cofactor un metal divalente que actúa como co-represor, el cual promueve y estabiliza su interacción con el DNA (6). En *Anabaena* sp. PCC 7120 existen tres marcos de lectura abiertos que coinciden con las características de los genes *fur*: *furA* (*all1691*), *furB* (*all2473*) y *furC* (*alr0957*) (17), que se corresponden con Fur, Zur y PerR respectivamente (5, 9). Estas proteínas son indispensables para *Anabaena* sp. PCC 7120, puesto que están involucradas en multitud de funciones esenciales para desarrollar una correcta respuesta a estreses abióticos.

2.4.1. FurA

FurA es una proteína homodimérica que en situaciones de alta concentración intracelular de Fe^{2+} se acompleja con este metal y se une a cajas Fur presentes en los promotores de los genes diana (18). Normalmente actúa como un represor transcripcional que en ausencia de hierro se disocia del DNA y permite la expresión de los genes que regula (18), aunque en algunos casos se ha visto que actúa como activador (19). FurA es un regulador transcripcional global, ya que controla la expresión de una gran variedad de genes implicados en diversos procesos fisiológicos como fijación de nitrógeno, fotosíntesis y respuesta a estrés oxidativo (19). De hecho se ha observado que reduciendo la expresión de *furA* se produce una expresión diferencial del 33 % del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (19).

En *Anabaena* sp. PCC7120 FurA funciona como regulador principal de la homeostasis del hierro a diferentes niveles, pues controla la expresión de genes implicados tanto en absorción, como transporte, almacenamiento y utilización de este metal. Una de las estrategias para sobrevivir a la deficiencia de

hierro consiste en su absorción a través de sideróforos, cuya síntesis en *Anabaena* sp. PCC 7120 está mediada por un cluster de nueve genes que están controlados por FurA y se desreprimen en condiciones de deficiencia de hierro (20). Lo mismo sucede con la regulación de la transcripción de las proteínas transportadoras ABC, encargadas de la traslocación de los complejos sideróforo-hierro del periplasma al citosol, y con los transportadores dependientes de TonB, que son proteínas receptoras de membrana que unen los complejos sideróforo-hierro (20). Además, FurA modula la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de tetrapirrol (20).

No obstante, FurA también está implicada en la respuesta de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno. Muchas de las proteínas involucradas en la formación y mantenimiento de los heterocistos son ricas en hierro, de manera que la disponibilidad de este metal determina la diferenciación a heterocistos, la actividad de la nitrogenasa y por tanto la fijación de nitrógeno (21). De hecho, se ha observado que en deficiencia de este elemento la expresión de *furA* aumenta en proheterocistos y se mantiene en heterocistos (21). Además la expresión de *furA* está regulada por NtcA, el principal regulador transcripcional del metabolismo del nitrógeno, cuya expresión es a su vez controlada por FurA (21, 22). De esta manera, si hay suficiente concentración de hierro en los proheterocistos, NtcA aumenta la expresión de *furA*, y este incremento de FurA a mitad del desarrollo de los heterocistos disminuye la expresión de *ntcA*. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro la expresión de *furA* aumenta muy pronto, inhibiendo de manera temprana la expresión de *ntcA* e impidiendo por tanto la formación de heterocistos (22). De este modo FurA está implicada en la regulación de la inducción transitoria de NtcA. Además, se ha descrito que FurA es capaz de unir 2-oxoglutarato, una molécula cuyos niveles se incrementan en condiciones de deficiencia de nitrógeno (23). Esto sugiere que las redes regulatorias de hierro y nitrógeno estarían interconectadas en *Anabaena* sp. PCC7120 a través de FurA (22).

2.4.2. FurB

FurB se corresponde con la proteína Zur de *Anabaena* sp. PCC7120 y es el principal regulador transcripcional de la homeostasis de zinc (5). FurB contiene varios sitios de coordinación y unión de zinc, lo que le permite modular su unión al DNA en función de la concentración citoplasmática de este metal (5), reprimiendo genes de respuesta a la deficiencia de zinc en presencia de suficiente concentración de este metal. En deficiencia de zinc, FurB permite la expresión de genes que dan lugar a la sustitución de metaloproteínas de zinc por otras que lleven a cabo la misma función pero tengan menos requerimientos de este metal, e induce la expresión de metalochaperonas y de sistemas de transporte de membrana implicados en la adquisición de zinc extracelular, como los transportadores ABC de la membrana plasmática (5).

El zinc, a pesar de ser un nutriente esencial, en exceso puede llevar a la generación de radicales tóxicos, pues es capaz de interaccionar fácilmente con los grupos tiol de las proteínas, especialmente aquellas implicadas en el transporte electrónico (24). Por tanto, el control de la homeostasis del zinc está muy relacionado con el estado redox intracelular, y por ello FurB también participa en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo. En concreto se ha observado que en una estirpe de delección de FurB la sensibilidad a peróxido de hidrógeno aumenta, mientras que su sobreexpresión incrementa la resistencia al estrés oxidativo (7, 25). Además FurB regula la expresión de la catalasa *alr0998*, la peroxidasa *sodA* y la peroxirredoxina *gct3* (25) y a altas concentraciones se une de manera inespecífica al DNA y lo protege del estrés oxidativo (26).

2.4.3. FurC

FurC ha sido propuesto como el ortólogo de PerR en *Anabaena* sp. PCC 7120. Esta proteína actúa principalmente como represor de genes de respuesta a estrés oxidativo y, cuando existe un alto nivel de peróxido de hidrógeno, sufre una oxidación catalizada por metal que hace se libere de las regiones promotoras de sus genes diana induciendo su expresión (9, 27). En concreto, FurC regula la expresión de cuatro peroxirredoxinas involucradas de la detoxificación de H₂O₂ (27).

Por otro lado, se ha observado que FurC también regula la expresión de *ftsH*, implicado en el ciclo de reparación del fotosistema II, relacionando así la calidad de la maquinaria fotosintética con el estrés oxidativo (27). Esto indica que probablemente la función de FurC no se limita únicamente a la respuesta a estrés oxidativo, sino que tiene un papel más global. De hecho, recientemente se ha descrito que esta proteína está implicada en el metabolismo del nitrógeno (28), pues FurC regula de manera directa genes implicados en la diferenciación temprana y formación de heterocistos, como *hetZ*; genes que participan en el desarrollo de la envuelta de los heterocistos, y genes que permiten la fijación de nitrógeno, como el operón *nifHDK* que codifica para proteínas estructurales del complejo nitrogenasa (28).

2.4.4. Evidencias de la existencia de redes de regulación integradas por proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCC 7120

El análisis transcriptómico de estirpes de delección o sobreexpresión de los tres parálogos FUR en *Anabaena* sp. PCC 7120 mostró que se producían cambios en un gran número de genes con funciones reguladoras. En concreto, el transcriptoma de una estirpe de delección condicional de FurA mostró que se producían cambios en más de 170 genes con funciones reguladores (19), en el transcriptoma de una estirpe de delección de FurB cambian cerca de 25 genes (datos no publicados) y el análisis del perfil transcripcional de una estirpe de sobreexpresión de FurC permitió determinar que cambiaban cerca de 10 genes en condiciones normales y 20 genes en condiciones de deficiencia de nitrógeno (28). Por tanto, además de regular genes de forma directa, estas evidencias indican que las proteínas FUR podrían regular una gran cantidad de genes de forma indirecta a través de otros reguladores transcripcionales o sistemas de dos componentes, estableciendo redes de regulación.

3. Objetivos

En este trabajo se quiso determinar si las proteínas FUR regulaban de forma directa genes con funciones reguladoras en *Anabaena* sp. PCC7120, lo que permitiría describir redes de regulación transcripcional integradas por las proteínas FUR. Además, dado que la respuesta a estreses abióticos como el estrés oxidativo y la deficiencia de nitrógeno son rutas cuya regulación parece estar interconectada a través de las proteínas FUR, también se quiso estudiar su posible relación con la existencia de estas redes de regulación. Así, se establecieron los siguientes objetivos:

- Identificar redes de regulación mediadas por las proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCC7120.
- Estudiar la unión de las proteínas FUR a las regiones promotoras de los tres parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120.
- Comprender algunos de los mecanismos de respuesta a estreses abióticos del regulador transcripcional FurC en *Anabaena* sp. PCC7120.

4. Materiales y métodos

4.1. Técnicas de trabajo con DNA

En este apartado se describen las técnicas empleadas para la amplificación y purificación de los promotores de los genes a estudiar.

4.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR se amplificaron los promotores de interés a partir de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC7120. El volumen final de cada mezcla de reacción de PCR fue de 100 μ L, compuesto por 72 μ L agua miliQ estéril, 10 μ L de Buffer 10x (Tris-HCl 75 mM pH 9, KCl 50 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM), 3 μ L de MgCl_2 50 mM, 2 μ L de dNTPs 10 mM, 2,5 μ L cebador directo 20 μ M, 2,5 μ L de cebador reverso 20 μ M, 1 μ L de Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L (Biotools) y 100 ng de DNA genómico. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). El programa y los cebadores utilizados en la PCR se recogen en las secciones 9.1 y 9.2 del Material Suplementario, respectivamente.

4.1.2. Electroforesis de DNA

El objetivo de la electroforesis fue comprobar que la amplificación de los promotores se produjo de manera correcta, sin productos inespecíficos y manteniendo la integridad del DNA. Para ello se llevó a cabo una electroforesis de DNA en geles de agarosa del 1 % (p/v) con un 1 % (v/v) de bromuro de etidio. Para preparar los geles se disolvieron 50 g de agarosa en 50 μ L de tampón TBE 1X (Tris-HCl 90 mM pH 8, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM) mediante calentamiento en microondas, se dejó enfriar, y, antes de que solidificase, se añadieron 50 μ L de bromuro de etidio 0,5 g/mL. En cada pocillo del gel se cargaron 4 μ L de la muestra de PCR a analizar mezclados con 3 μ L de tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, 30 % (v/v) de glicerol y 0,25 % (p/v) de azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 1x a 90 V durante 30 minutos.

4.1.3. Purificación y cuantificación de los productos de PCR

Una vez comprobada la correcta amplificación de los productos de PCR, estos se purificaron y cuantificaron. La purificación se realizó para eliminar los reactivos de la reacción de PCR, como oligonucleótidos y dNTPs, que podrían interferir en futuras etapas de trabajo. Para ello se empleó el kit GFXTM PCR DNA and Gel band Purification (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la concentración de los productos de PCR empleando el equipo NanoVue PlusTM (GE Healthcare).

4.2. Técnicas de trabajo con RNA

Se emplearon técnicas de trabajo con RNA para determinar la expresión de genes de interés mediante Real Time RT-PCR. Al trabajar con RNA hay que tener en cuenta la presencia ubicua de ribonucleasas (RNasas), lo que implica lavar los materiales y superficies de trabajo con NaOH 0,4 M y emplear agua y reactivos libres de RNasas y puntas de micropipeta con filtro.

Se partió de RNA extraído de cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120 y de una estirpe de sobreexpresión del regulador transcripcional FurC (EB2770FurC) sometidos a dos condiciones de estrés: deficiencia de nitrógeno y estrés oxidativo. Las muestras de cultivos en deficiencia de nitrógeno consistían en RNAs extraídos de cultivos de ambas estirpes tras 48 horas de crecimiento en medio BG11 completo y en medio BG11 carente de NaNO_3 . Por su parte, las muestras de cultivos sometidos a estrés oxidativo consistían en RNAs extraídos de cultivos de ambas estirpes tras 1 hora de crecimiento en condiciones estándar o sometidos a 250 μ M de H_2O_2 .

4.2.1. Retrotranscripción

Mediante la retrotranscripción del RNA se obtuvo cDNA complementario al RNA. Para la retrotranscripción se añadieron a un tubo de PCR 2 µg de RNA, 1 µl de solución de ‘random primers’ (300 ng/µL, Invitrogen), 2 µL de tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y KCl 150 mM) y se completó el volumen hasta 20 µL con agua libre de RNasas. Se desnaturalizaron las muestras a 85 °C durante 10 minutos y se hibridaron los ‘random primers’ durante 60 minutos a 50°C. Tras ello se añadieron a los tubos 2 µL de mezcla de dNTPs 10 mM, 4 µL de DTT 0,1 M, 8 µL de tampón de retrotranscripción 5x, 5 µL de agua libre de RNasas y 1 µL de SuperScript Reverse Transcriptase® 200 U (Invitrogen). Esta mezcla se incubó a 47°C durante 60 minutos para que tuviera lugar la extensión de los cebadores, y finalmente durante 15 minutos a 75°C con el fin de detener la reacción, conservando las muestras a -20 °C.

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

Los transcritos de interés en forma de cDNA se cuantificaron mediante Real Time RT-PCR, y se normalizaron con respecto al gen constitutivo *rpnB* para así estudiar los cambios en la expresión de genes de interés. La Real Time RT-PCR se realizó en placas de 96 pocillos MicroAmp™ y la mezcla de reacción por cada pocillo consistió en 12,5 µL de SyBR® green, 7,1 µL de agua libre de RNasas, 0,2 µL primer reverso 25 mM y 0,2 µL primer directo 25 mM. Se preparó una mezcla de reacción para cada gen a estudiar y se añadieron en cada pocillo 20 µL de esta mezcla y 10 µL del cDNA de interés diluido 50 veces en agua libre de RNasas. El programa utilizado para realizar la Real Time RT-PCR y el tratamiento matemático de los datos, así como los cebadores empleados, se encuentran en las secciones 9.3 y 9.4 de Material Suplementario.

4.3. Purificación de proteínas

En este trabajo se llevó a cabo la purificación de FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 a partir de biomasa de células de *E. coli* BL21 que sobreexpresaban esta proteína.

4.3.1. Lisis celular

Se llevó a cabo una lisis celular por sonicación de la biomasa de partida. Para ello se tomaron 10 g de biomasa de células de *E. coli* BL21, se resuspendieron en 60 mL de tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM) y se añadió media pastilla de coctel de inhibidor de proteasas (Roche). Se realizaron 10 ciclos de sonicación de 45 segundos a amplitud del 85 % y ciclo 0,5 y 30 segundos de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, manteniendo las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento. Una vez lisadas las células, el extracto crudo se centrifugó en una centrifugadora Beckman a 18000 rpm (39200 g) a 4°C durante una hora. Finalmente, se filtró el sobrenadante con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro.

4.3.2. Purificación de FurC

La proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 se purificó en dos pasos: una cromatografía de afinidad de Heparina empleando la matriz Heparin Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) y una cromatografía de intercambio iónico en matriz de DEAE celulosa (Whatman DE-52), trabajando en todo momento a 4 °C. Antes de comenzar a empaquetar las columnas, las resinas se dejaron atemperar a temperatura ambiente para evitar la formación de burbujas, y se lavó todo el material con agua destilada.

Para empaquetar las columnas las matrices se añadieron en columnas de vidrio de 1,5 cm de diámetro (BioRad) empaquetando primero por gravedad y luego con agua miliQ a un flujo de 5-10 mL/min hasta conseguir 20 mL de resina empaquetada. A continuación se equilibraron con 5 volúmenes del tampón de purificación correspondiente (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM para la columna de heparina y Tris-HCl 50 mM pH 7,5 para la columna de intercambio iónico).

Se aplicaron 20 mL del extracto crudo filtrado directamente sobre la columna de Heparina a un flujo de 2 mL/min, velocidad que se empleó a lo largo de todo el protocolo de purificación. Tras ello se lavó la columna con 6 volúmenes de tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM). La elución de FurC se realizó con 60 mL de un gradiente creciente de NaCl (de 0 a 0,5 M NaCl) disuelto en tampón de purificación seguido de 4 volúmenes de tampón de elución (NaCl 500 mM disuelto en tampón de purificación) y se recogieron fracciones de 1,5 mL.

Las fracciones obtenidas tras la purificación se analizaron mediante una electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 17 % (sección 4.3.3), cuyos resultados se recogen en la sección 9.5 de Material Suplementario. Así se seleccionaron las fracciones con mayor contenido y pureza en FurC para la cromatografía de intercambio iónico, las cuales se combinaron e introdujeron en una tripa de diálisis y se sometieron a dos ciclos de diálisis en 3 L de una disolución Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 4 °C.

En la segunda parte de la purificación, la proteína obtenida tras la cromatografía de afinidad se aplicó en la columna de DEAE-celulosa. La columna se lavó con 6 volúmenes de tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5), y se eluyó la proteína con 100 mL de un gradiente creciente de NaCl (de 0 a 0,5 M NaCl) disuelto en tampón de purificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5) seguido de 6 volúmenes de tampón de elución (NaCl 500 mM disuelto en tampón de purificación).

Las fracciones anteriores se cuantificaron por espectrofotometría realizando un espectro entre 250 y 300 nm, y se seleccionaron aquellas con mayor absorbancia a 280 nm con respecto a 260 nm. Estas fracciones se combinaron y se sometieron a dos ciclos de diálisis en 3 L de una disolución Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 4 °C. Finalmente se cuantificó la proteína espectrofotométricamente mediante la ley de Beer Lambert, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de FurC a 276 nm es de 13490 M⁻¹ cm⁻¹.

4.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

La electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se utilizó para asegurar la correcta purificación y seleccionar las fracciones con mayor pureza y cantidad de FurC. Los geles se componían de una región separadora al 17 % de acrilamida/bisacrilamida y una región concentradora al 5 % y su composición se refleja en la sección 9.6 de Material Suplementario.

Se tomaron 15 µL de cada fracción a analizar y se mezclaron con 3 µL de tampón de carga 5x (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (p/v) SDS, 1 % (v/v) β-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol y 0,02 % (p/v) de azul de bromofenol). Estas muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos para desnaturizar las proteínas y se centrifugaron a 12000 rpm (16260 g) durante 5 minutos. A continuación se limpiaron manualmente los pocillos, se cargaron 15 µL del sobrenadante y se llevó a cabo la electroforesis a una corriente de 35 mA por gel durante 45 minutos, en un tampón compuesto por 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM glicina y 3,5 mM SDS. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel con una solución de azul de Coomassie (azul Coomassie 0,25 % (p/v), metanol 45 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v) en agua) durante 20 minutos. Finalmente, se destiñó con una solución decolorante con la misma composición, pero sin azul de Coomassie.

4.4. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

Mediante los ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) se estudió la capacidad de las proteínas FurA, FurB y FurC de unirse *in vitro* a las regiones promotoras de los genes de estudio. Esta técnica se basa en la capacidad de los reguladores transcripcionales de reconocer y unirse al DNA diana, formando un complejo proteína-DNA que muestra una migración retardada en una electroforesis nativa. Para asegurar que la unión de la proteína al DNA diana es específica, los ensayos se realizaron en presencia de un DNA competidor, un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*).

Estos ensayos se hicieron en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 6 % en un equipo Dual Gel Caster (BioRad). La composición de estos geles se muestra en la sección 9.7 de Material Suplementario. Los geles se precorrieron a 60 V y 4 °C durante 1 hora en Running Buffer (30,28 g/L Tris-HCl, 142 g/L glicina pH 8,5), que en el caso de FurC contenía MnCl₂ a una concentración final de 100 µM.

Las mezclas de reacción se prepararon mezclando distintas concentraciones de proteína (300, 400 y 500 nM en el caso de FurA; 100, 200 y 300 nM en el caso de FurB y 100, 175, 250 nM en el caso de FurC) con 50 ng del fragmento de DNA de interés, 50 ng del DNA inespecífico (*ifpkn22*), 2 µL de tampón de unión (Bis-Tris 10 mM pH 7,5, KCl 40 mM, glicerol 5 % (v/v)), 1 µL de albumina sérica bovina 1 mg/mL, 1 µL de DTT 20 mM, 1µL de MnCl₂ 2 mM en el caso de FurA y FurC y 1 µL ZnSO₄ 0,1 mM en el caso de FurB, completando el volumen hasta 20 µL con agua miliQ. Las muestras se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la interacción entre las proteína y el DNA, y finalmente se añadieron a cada mezcla 3 µL de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 30 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05 % (p/v)). Se limpiaron manualmente los pocillos del gel y se cargaron 20 µL de muestra, incluyendo un control negativo con el promotor en ausencia de proteína. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 90 minutos a 4 °C en Running Buffer (30,28 g/L Tris-HCl, 142 g/L glicina pH 8,5), que en el caso de FurC contenía MnCl₂ a una concentración final de 100 µM. Transcurrido ese tiempo los geles se tiñeron en 50 mL de Running Buffer con 3 µL de SyBr® Safe Fluorescent Dye 1 µg/mL durante 10 minutos en agitación y oscuridad y finalmente se revelaron en un transiluminador BioRad Gel Doc 2000.

4.5. Técnicas bioinformáticas

En este trabajo se emplearon herramientas bioinformáticas para determinar la presencia de cajas de unión de FurB y FurC en las regiones promotoras de genes de funciones reguladoras que mostraron expresión diferencial en el perfil transcriptómico de una estirpe de delección de FurB y una estirpe de sobreexpresión de FurC, respectivamente. Para ello se introdujeron las matrices de peso de cada caja y las regiones promotoras a analizar en formato FASTA en el servidor 'FIMO', una herramienta de 'The MEME Suite' que escanea las secuencias que se le proporcionan en busca del motivo introducido. Tras finalizar este análisis se seleccionaron aquellos genes para los que se predecía la existencia de caja con un p-valor menor de 10⁻⁴. Las matrices de peso empleadas en la búsqueda de cajas se encuentran en la sección 9.8 del Material Suplementario.

5. Resultados

5.1. Estudio de unión de las proteínas FUR a promotores de genes con funciones reguladoras

Para determinar si las proteínas FUR regulan de forma directa genes con funciones reguladoras se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel (EMSA) de las proteínas FUR con las regiones promotoras de estos genes. Estos ensayos se realizaron tomando fragmentos de DNA de 300-400 pb situados upstream del inicio de transcripción de los genes seleccionados para el estudio. Para confirmar que la unión fue específica se introdujo un fragmento interno del gen *pkn22* (*ifpkn22*) como DNA competidor.

5.1.1. Estudio de la unión de FurA a promotores de genes con funciones reguladoras

En el caso de FurA la selección de reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes a analizar se basó en un estudio en el cual se realizó una búsqueda de la caja de unión de FurA en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (29). Además, aunque no se había predicho la existencia de caja de unión de FurA en su región promotora, también se consideraron genes de funciones reguladoras que presentaban anotación funcional y cuya expresión estaba alterada en el transcriptoma de una estirpe de delección condicional de FurA (19).

Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo en presencia de 1 mM de DTT y 0,1 mM de MnCl₂, que son las condiciones en las que el regulador transcripcional FurA está activo (18). Se usaron tres concentraciones de proteína: 300, 400 y 500 nM.

Los genes analizados fueron *alr2595*, *all7584*, *all3348*, *all1804*, *abrB* (*all2080*), *sixA* (*alr0221*), *lytS* (*alr0803*), *rpaA* (*all0129*), *all1651*, *alr0072*, *all3903*, *alr1308*, *all3564*, *all1704*, *pknE* (*alr3732*) y *pknD* (*alr4368*). Todos estos genes presentaban en sus regiones promotoras cajas de unión de FurA, a excepción de *abrB*, *sixA*, *rpaA*, *lytS*, *pknE* y *pknD* en los que no se ha predicho presencia de caja pero sí mostraron expresión diferencial en el transcriptoma de la estirpe de delección condicional de FurA, así como anotación funcional. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 1.

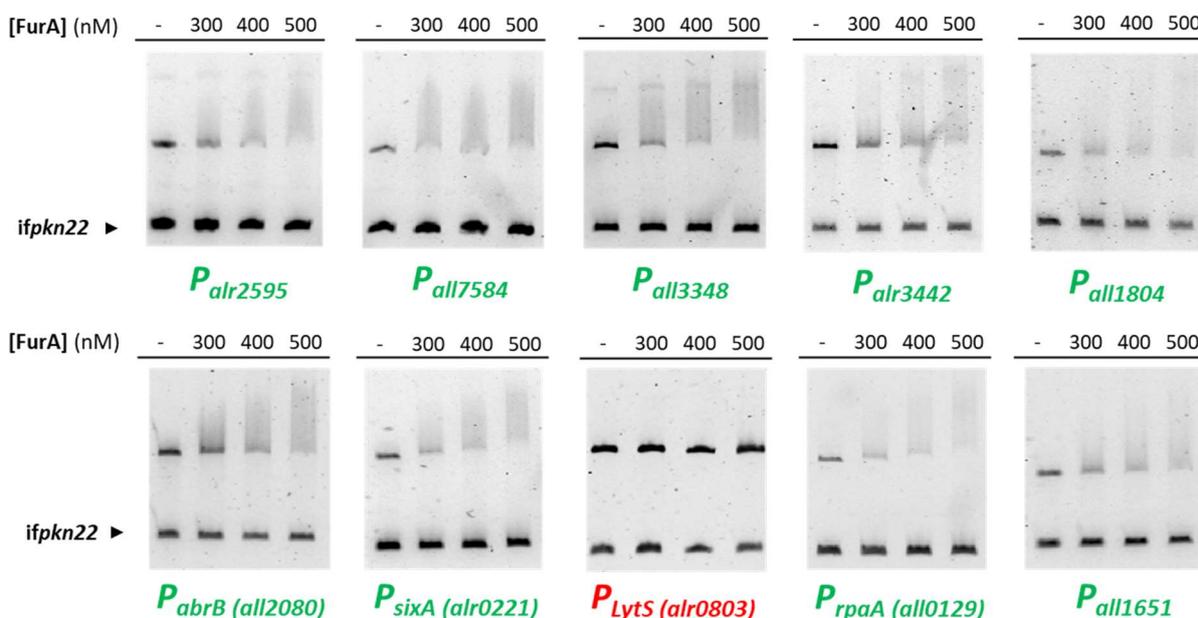


Figura 1. Ensayos de retardo en gel de FurA con regiones promotoras de genes con funciones reguladoras. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo) y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (300, 400, y 500 nM respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurA a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde y en los que no se observó unión se muestran coloreados en rojo. Como control positivo se usó el promotor del gen *isiB* (*alr2405*) (18) y como control negativo el promotor del gen *nifJ* (*alr1911*) (19).

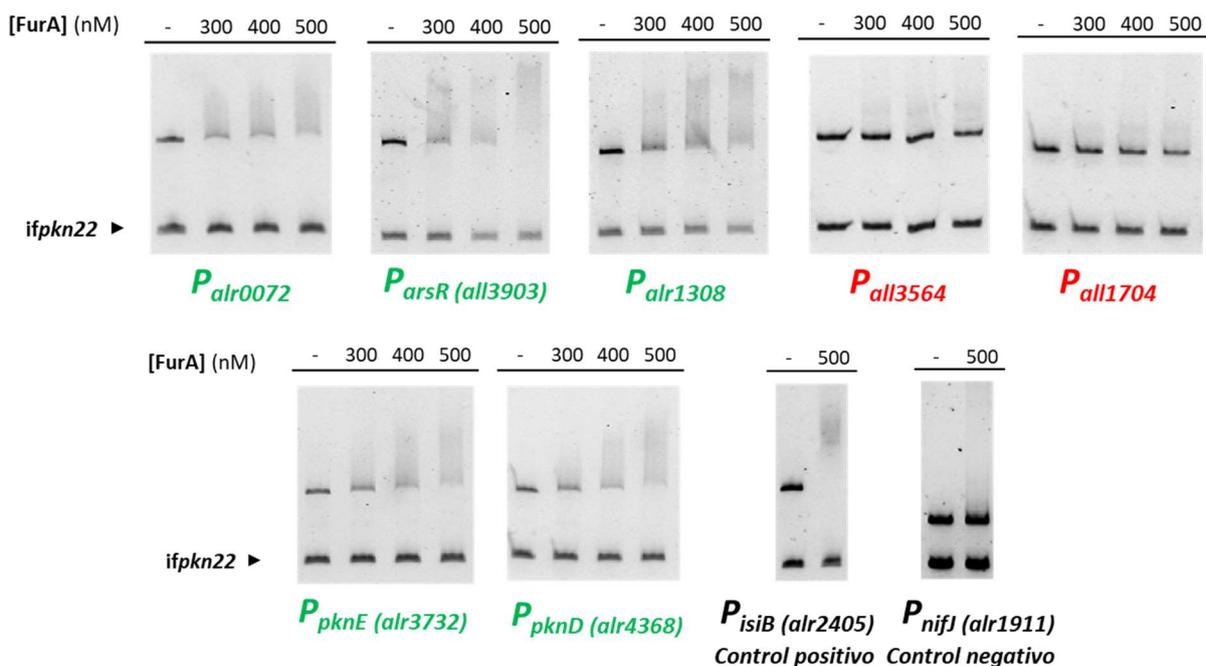


Figura 1 (Cont). Ensayos de retardo en gel de FurA con regiones promotoras de genes con funciones reguladoras.

Como se observa en la figura 1, FurA es capaz de unirse *in vitro* a casi todas las regiones promotoras de los genes implicados en funciones reguladoras en los que se había predicho la presencia de caja FurA y/o se había visto expresión diferencial en los análisis transcriptómicos, a excepción de los genes *lytS* (*alr0803*), *all3584* y *all1704* para los que no se observó unión de la proteína FurA a su región promotora.

Por otro lado, se puede observar que la afinidad de FurA por las regiones promotoras no es la misma para todos los genes que han resultados positivos. Por ejemplo, los genes *all3903*, *rpaA* (*all0129*) o *sixA* (*alr0221*) muestran un mayor retardo que los genes *alr0072* o *abrB* (*all2080*), lo que indica que FurA presenta mayor afinidad por los primeros.

5.1.2. Estudio de la unión de FurB a promotores de genes con funciones reguladoras

La selección de los genes con funciones reguladoras a estudiar mediante EMSA con FurB se basó en la predicción de la presencia de cajas de FurB en los genes de funciones reguladoras cuya expresión cambiaba en el transcriptoma de una estirpe de delección de FurB (datos no publicados). Esta predicción se realizó mediante las técnicas bioinformáticas descritas en la sección 4.5 de Materiales y Métodos y sus resultados se recogen en la Tabla 1. En concreto, se seleccionaron para su estudio aquellos genes que cambiaban en el transcriptoma de la estirpe de delección de FurB y en los que se predecía la existencia de una caja de FurB con un p-valor menor de 10^{-4} . Así se seleccionaron para el estudio los genes *alr0900*, *all5210*, *all7584*, *all4986*, *alr0072*, *alr0428*, *alr7219* y *orrA* (*all3768*).

Gen	Hebra	p-valor	Secuencia caja
<i>all7621</i>	-	1.12e-06	TAAAATGATAACCATTTGTACAATTG
<i>alr0803</i>	+	7.5e-06	CCTAATAAAAATAATTATTTTAA
<i>alr3165</i>	-	1.21e-05	TAAGATAATTTTAATAATCAAATCA
<i>all7584</i>	+	1.24e-05	CTAGTTAATAATCAATATCTAACAG
<i>all7621</i>	+	1.28e-05	GAGATTGATAACTATTGCTAAGTAA
<i>alr0072</i>	+	1.35e-05	AAGTCTGAAAAAATTTATCAATTTT
<i>alr0900</i>	-	1.7e-05	GATAATGAGATTTTTATTCAAGCTA
<i>alr0803</i>	-	1.98e-05	ATTTTAAAAATAATTATTTTATT
<i>alr0803</i>	+	1.99e-05	AATAAAAATAATTATTTTAAAAAT
<i>alr0803</i>	-	2.09e-05	AGTACTGAATACAATACTAATAAAA
<i>alr0428</i>	-	3.61e-05	CATCCTCTTAATTATTCTTAAATTA
<i>orrA</i>	+	4.59e-05	TAAGATGAAATTAATTTAAAACAT
<i>alr3165</i>	-	5.19e-05	ACTTAAGATAATTTAATAATCAAA
<i>alr0072</i>	-	6.27e-05	AAAATTGATAAATTTTTCAGACTT
<i>all4986</i>	+	6.4e-05	AATCCTCATAATTTTATTTATTAT
<i>alr0803</i>	+	6.49e-05	AGTAATGAAATCAATTATTTTCTAA
<i>all7609</i>	+	6.7e-05	CTTTGTGAGAACAATCCCCAAAGT
<i>all5210</i>	+	6.96e-05	TTATATAAAATTGATTTTCGTCAG
<i>all4986</i>	+	7.06e-05	ATTTATATGAACAGTTATCTAGATT
<i>alr7219</i>	+	8.49e-05	AATCCTAAAAACCTTTCTTCTTCTA
<i>alr3165</i>	-	8.93e-05	TGAAATGAAATATTTATATGATGT

Tabla 1. Resultado de la búsqueda de cajas FurB en las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras.

Los ensayos de retardo en gel se realizaron con 1 mM de DTT y 5 μ M de ZnSO₄ que son las condiciones en las que el regulador transcripcional FurB está activo. Se usaron tres concentraciones de proteína: 100, 200 y 300 nM, (25). Los resultados se muestran en la figura 2.

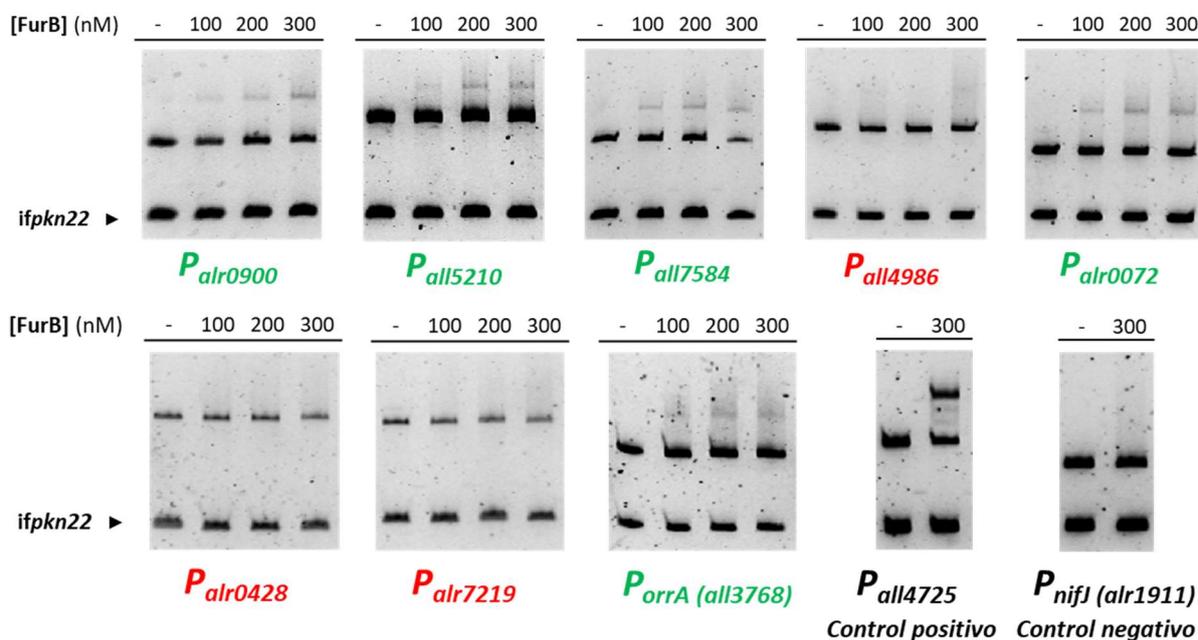


Figura 2. Ensayos de retardo en gel de FurB con las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo), y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (100, 200, y 300 nM respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurB a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde y en los que no se observó unión se muestran coloreados en rojo. Como control positivo se usó el promotor del gen *all4725* (25) y como control negativo el promotor del gen *nifJ (alr1911)* (25).

En la figura 2 se observa como la proteína FurB es capaz de unirse *in vitro* y formar complejos con los promotores de los genes *alr0900*, *all5210*, *all7584*, *alr0072* y *orrA* (*alr3768*). Sin embargo los genes *alr7219*, *alr0428* y *all4986* no mostraron retardo. La afinidad por todos los promotores regulados directamente por FurB parece ser similar, ya que no hay diferencias en los retardos.

5.1.3. Estudio de la unión de FurC a promotores de genes con funciones reguladoras

Los ensayos de retardo en gel con FurC se realizaron con las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras que mostraron expresión diferencial en una estirpe de sobreexpresión de FurC (28), y en las que se encontraron cajas de unión de FurC con un p-valor menor de 10^{-4} tras realizar una predicción mediante técnicas bioinformáticas (Tabla 2). Además también se incluyeron genes de funciones reguladoras que se obtuvieron al realizar una búsqueda de la caja de unión de FurC en el genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (manuscrito en preparación). Así, los genes que se estudiaron fueron *asr2041*, *alr3281*, *alr2137*, *all7016*, *alr2325*, *all0345*, *all1651*, *all1071*, *all3788*, *all5323* y *alr0264*.

Gen	Hebra	p-valor	Secuencia caja
<i>all7016</i>	-	4.22e-06	TAATCTCAATTCGATTTTG
<i>all2165</i>	+	6.55e-06	TAAAAGCAAAATGAGTACA
<i>alr9013</i>	+	1.58e-05	CAACATCATGCTGAGAATA
<i>all0345</i>	-	2.1e-05	TATAATCAATTCCAGTTCA
<i>all1651</i>	-	2.3e-05	ATAAATCATAAAAACACTGCA
<i>alr3281</i>	-	2.52e-05	AGTAGTCATACTAACATTA
<i>all3788</i>	+	2.82e-05	AAATATCAAATAGAGTCTG
<i>all0929</i>	+	3.86e-05	TATTGTCATGCCCAAATG
<i>alr2572</i>	+	4.38e-05	TTTGCTCATTAACAGTTTA
<i>all1071</i>	+	5.22e-05	AATTATCATGAATACTGTG
<i>asr2041</i>	-	5.74e-05	CGTAATCATAACAATATAA
<i>all4687</i>	-	5.91e-05	TTATCTCAACTACTAATTCA
<i>all0929</i>	-	6.42e-05	AAATCTCATAACCATTTAG
<i>alr2325</i>	-	6.76e-05	TTACAACATAACAATTATG
<i>alr0264</i>	+	8.87e-05	TGAAATCAATAACACTAAG
<i>alr2325</i>	+	9.3e-05	CAAACACTATTTTTAGTAGA
<i>asr2041</i>	+	9.67e-05	TTAACCCAAGAAGAGTTTG
<i>all3788</i>	-	9.77e-05	GGAAAGCATCACCATATTG

Tabla 2. Resultado de la búsqueda de cajas FurC en las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras.

Se trabajó con 1 mM de DTT y 0,1 mM de $MnCl_2$ que son las condiciones en las que el regulador transcripcional FurC está activo (27). Se usaron tres concentraciones de proteína: 100, 175 y 250 nM.

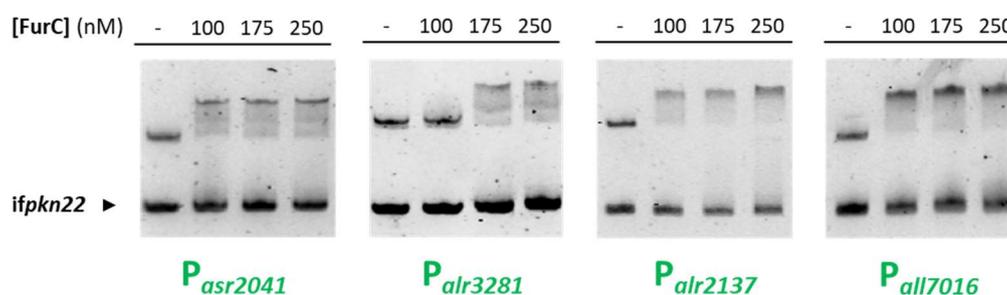


Figura 3. Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo), y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (100, 175, y 250 nM respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurC a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde y en los que no se observó unión se muestran coloreados en rojo. Como control positivo se usó el promotor del gen *hetZ* (*alr0099*) (28) y como control negativo el promotor del gen *nifJ* (*alr1911*) (28).

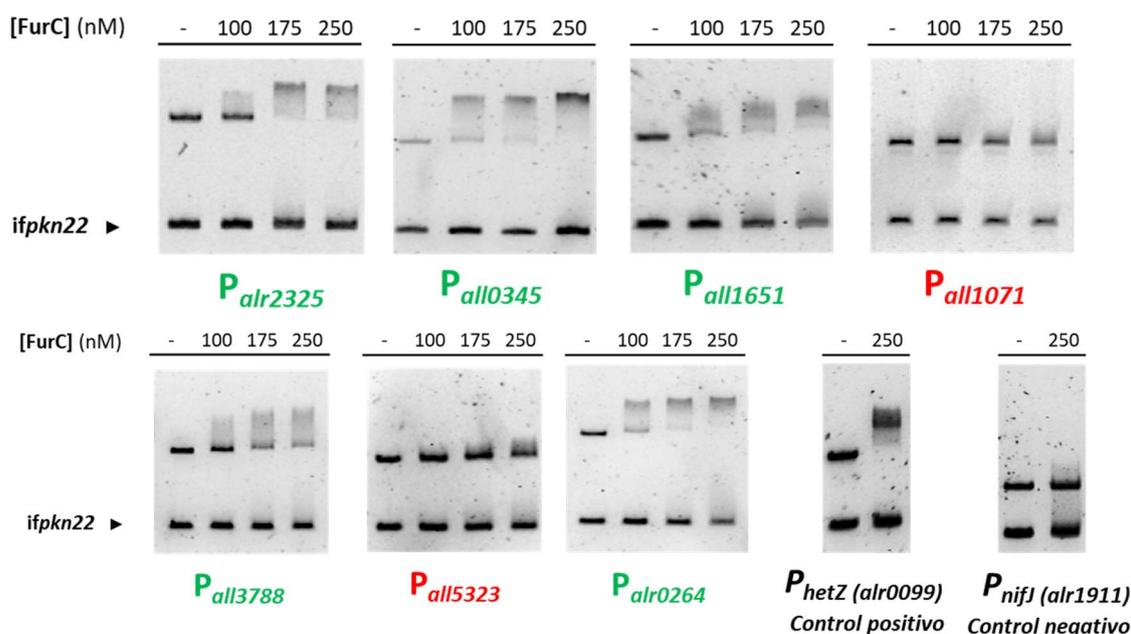


Figura 3 (cont.). Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de genes con funciones reguladoras.

En la figura 3 se observa que FurC es capaz de unirse *in vitro* a prácticamente todas las regiones promotoras de los genes con funciones reguladoras cuya expresión cambia en el transcriptoma de sobreexpresión de FurC y que contienen caja de unión de esta proteína, siendo las únicas excepciones los genes *all1071* y *all5323*. De entre todos los genes positivos FurC muestra mayor afinidad por *alr2137*, *all0345* y *alr0264*, ya que muestran retardo a concentraciones menores de proteína.

5.2 Cross-regulación entre los tres parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120

Estudios previos sugerían que podía existir cross-regulación entre las tres proteínas FUR de *Anabaena* sp. PCC7120 (17). No obstante los resultados no eran concluyentes porque las condiciones en las que se realizaron los ensayos no eran las condiciones óptimas de unión de las proteínas FUR en sus regiones promotoras *in vitro*. Por ello, en este trabajo, también se decidió repetir estos experimentos para estudiar la unión de proteínas FUR a las regiones promotoras de los tres parálogos FUR. En concreto se estudió la unión de FurA, FurB y FurC a los promotores de los tres genes (*furA*, *furB* y *furC*).

En la figura 4 se muestran los resultados del estudio de unión de FurA a las regiones promotoras de los tres parálogos Fur de *Anabaena* sp. PCC7120.

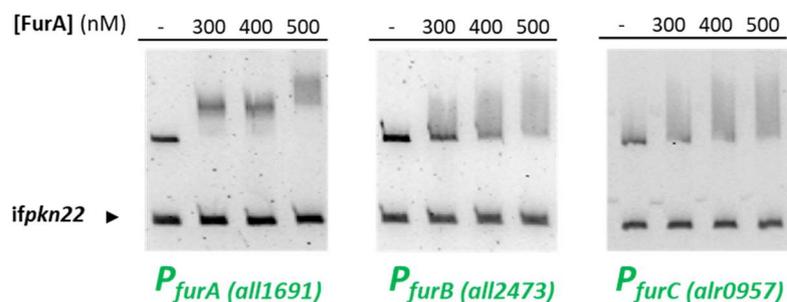


Figura 4. Ensayos de retardo en gel de FurA con las regiones promotoras de los genes de *furA*, *furB* y *furC*. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo) y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (300, 400 y 500 nM, respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurA a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde.

Como se observa en la figura 4, FurA es capaz de unirse a su propia región promotora, así como a las regiones promotoras de *furB* y de *furC*. Sin embargo, se une con mayor afinidad a su propio promotor que al de los otros dos parálogos.

Al igual que para FurA, también se determinó si FurB era capaz de unirse a las regiones promotoras de los tres parálogos Fur de *Anabaena* sp. PCC7120. Los resultados se muestran en la figura 5.

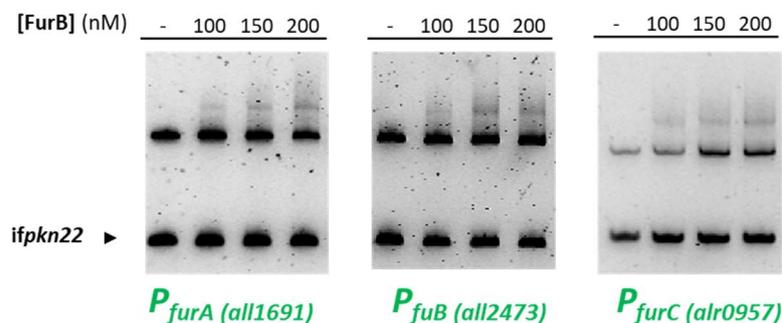


Figura 5. Ensayos de retardo en gel de FurB con las regiones promotoras de los genes de *furA*, *furB* y *furC*. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo), y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (100, 200, y 300 nM respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurB a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde.

Como se observa en la figura 5, FurB es capaz de formar complejos con su propio promotor, así como con las regiones promotoras de *furA* y de *furC*.

Finalmente también se estudió la cross-regulación con FurC y las regiones promotoras de los tres parálogos Fur de *Anabaena* sp. PCC7120. Los resultados se muestran en la figura 6.

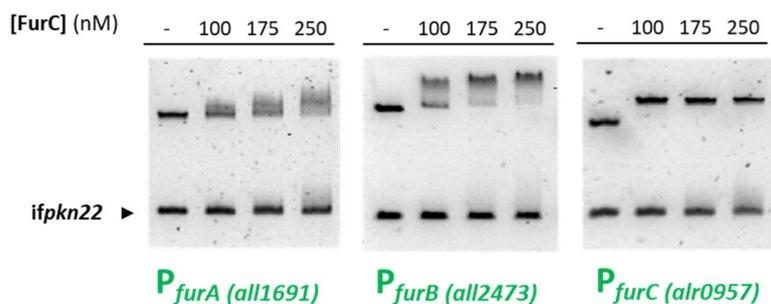


Figura 6. Ensayos de retardo en gel de FurC con las regiones promotoras de los genes de *furA*, *furB* y *furC*. El carril 1 contiene el promotor del gen sin proteína (control negativo), y los carriles 2, 3 y 4 se corresponden con el promotor incubado con concentraciones crecientes de proteína (100, 175, y 250 nM respectivamente). Los genes para los que se observó unión de FurB a sus regiones promotoras aparecen coloreados en verde.

En la figura 6 se observa como FurC forma complejo con su propio promotor, así como con el de *furA* y el de *furB*. Esta proteína presenta mucha más afinidad por su propio promotor que con por el del resto de proteínas FUR (figura 6).

En definitiva, en vista de los resultados se puede afirmar que sí que existe cross-regulación entre los tres parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120. Observando los tres ensayos EMSA realizados con cada una de las proteínas parece que FurB es quizá la que menos afinidad tiene por estas regiones promotoras. Además, tanto en FurA como en FurC se observa que presentan mayor afinidad por sus respectivos promotores

5.3. Análisis por Real Time RT-PCR de cambios en la expresión de una selección de genes directamente regulados por FurC en respuesta a deficiencia de nitrógeno y estrés oxidativo

El regulador transcripcional FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 inicialmente mostró estar implicado en la respuesta frente a estrés oxidativo y se propuso como el ortólogo a PerR en *Anabaena* sp. PCC 7120, pues se observó que era capaz de sensar el peróxido de hidrógeno a través de una oxidación catalizada por metal (7). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que FurC también está implicado en la respuesta de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno y juega un papel clave en la formación del heterocisto (28). Para comprender cómo este regulador transcripcional es capaz de responder a estos dos estreses, en este trabajo se decidió estudiar los cambios en la expresión de una selección de genes directamente regulados por FurC en respuesta a deficiencia de nitrógeno y estrés oxidativo.

En primer lugar se decidió estudiar en ambas condiciones la expresión de dos dianas canónicas de cada uno de estos dos estreses: el gen *hetZ*, que es un gen implicado en la diferenciación del heterocisto y que es activado por FurC en condiciones de deficiencia de nitrógeno, y el gen *prxA*, que codifica para la peroxirredoxina, un gen implicado en la respuesta frente a estrés oxidativo. Los resultados se muestran en la figura 7.

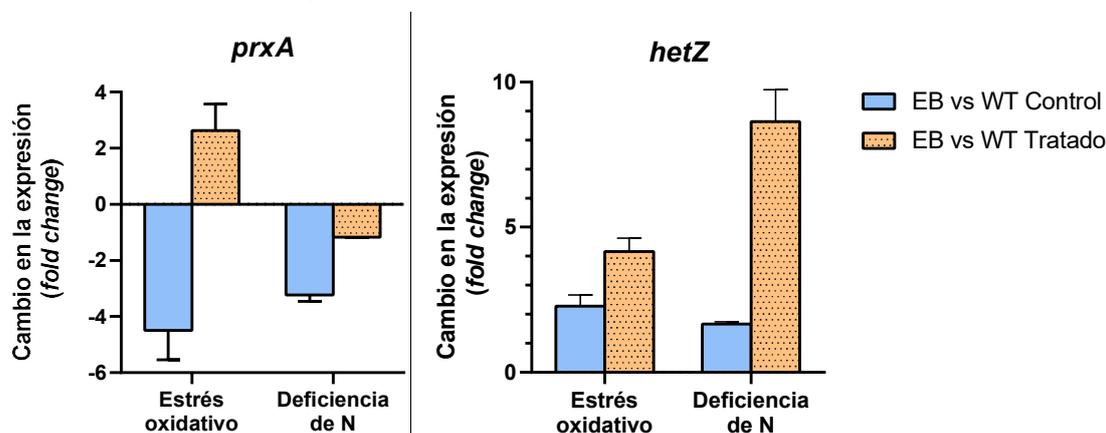


Figura 7. Cambio en los niveles de expresión de los genes *prxA* y *hetZ* en la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre tras 1 hora de cultivo en presencia de H_2O_2 250 μ M (Estrés oxidativo) y tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de $NaNO_3$ (Deficiencia de N) medidos mediante Real Time RT-PCR. Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas y solo se consideraron cambios significativos si el cambio en la expresión era superior a $\pm 1,5$.

Como se puede observar en la figura 7, en el caso del gen *prxA* al someter al cultivo a estrés oxidativo se produce una desrepresión de este gen, que pasa de estar 4 veces menos expresado en la estirpe de sobreexpresión de FurC que en la estirpe silvestre en condiciones normales, a estar 2 veces más expresado en la estirpe de sobreexpresión de FurC que en la estirpe silvestre en condiciones de estrés oxidativo. En cambio al someter al cultivo a una deficiencia de nitrógeno no se observa esta desrepresión. Por su parte el gen *hetZ* en condiciones normales no presenta apenas cambio de expresión en la estirpe de sobreexpresión de FurC con respecto a la estirpe silvestre en condiciones normales. Sin embargo, en una situación de estrés oxidativo está 4 veces más expresado en la estirpe de sobreexpresión de FurC que en la estirpe silvestre, y en una situación de deficiencia de nitrógeno está 8 veces más expresado en la estirpe de sobreexpresión de FurC que en la estirpe silvestre.

A continuación, tras haber observado que no todas las dianas de FurC cambian su expresión de la misma forma en respuesta al estrés oxidativo y a la deficiencia de nitrógeno se decidió estudiar los cambios en la expresión de dos dianas de FurC identificadas en este trabajo, una correspondiente al gen *alr2137*, que codifica para una histidín quinasa de la familia NarL y otra correspondiente al regulador transcripcional AnCrpB (*alr2325*), en condiciones de estrés oxidativo y deficiencia de nitrógeno (Figura 8).

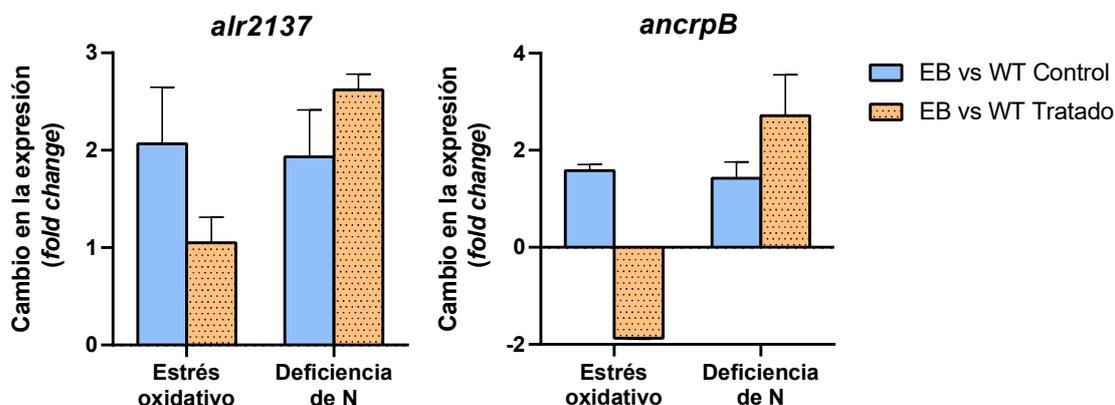


Figura 8. Cambio en los niveles de expresión de los genes de la histidín quinasa de la familia NarL (*alr2137*) y del regulador transcripcional AnCrpB (*alr2325*) en la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre tras 1 hora de cultivo en presencia de H_2O_2 250 μ M (Estrés oxidativo) y tras 48 horas de cultivo en medio BG-11 carente de $NaNO_3$ (Deficiencia de N) medidos mediante Real Time RT-PCR. Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas y solo se consideraron cambios significativos si el cambio en la expresión era superior a $\pm 1,5$.

Como se puede observar en la figura 8 el gen de la histidín quinasa de la familia NarL muestra una pequeña represión en condiciones de estrés oxidativo, pues pasa de estar 2 veces más expresado en la estirpe de sobreexpresión de FurC que en la estirpe silvestre en condiciones normales a tener la misma expresión en ambas estirpes en condiciones de estrés oxidativo. En cambio al someter al cultivo a una deficiencia de nitrógeno no se observan cambios significativos en su expresión (test estadístico ANOVA de dos vías no significativo). Por su parte, en el caso del gen del regulador transcripcional AnCrpB se produce una ligera disminución en su expresión en condiciones de estrés oxidativo y una pequeña inducción en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

6. Discusión

6.1 Red de regulación mediada por FurA

FurA es un regulador transcripcional que regula la homeostasis del hierro a través de dianas directas, como proteínas transportadoras ABC o un cluster de nueve genes que regula la síntesis de los sideróforos (20). También se ha descrito FurA como regulador directo de la respuesta a la deficiencia de nitrógeno a través de la regulación de la expresión transitoria de NtcA (22). Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que FurA es un regulador global, ya que una estirpe de delección condicional de FurA muestra una expresión diferencial de un tercio de los genes del genoma de *Anabaena* sp. PCC7120 (19). Esto indica que probablemente muchos de estos genes no sólo estén regulados directamente por FurA sino también de manera indirecta a través otras proteínas con funciones reguladoras localizadas jerárquicamente por debajo, es decir, a través de redes de regulación global mediadas por FurA. Con el objetivo de estudiar estas redes, en este trabajo se han ensayado diversos genes con funciones reguladoras en los que se ha predicho caja de unión de FurA y/o muestran expresión diferencial en el transcriptoma de la estirpe de delección condicional de FurA. Se ha observado que FurA es capaz de unirse a todas las regiones promotoras de estos genes, a excepción de *lysS* (*alr0803*), *all3584* y *all1704*, lo que indica que probablemente estos genes estén regulados de manera indirecta por FurA o que sean efectos compensatorios, porque, aunque no mostraron retardo cuando se incubaron con la proteína *in vitro*, sí que presentaron cambio de expresión en el transcriptoma de FurA.

Cuatro de las dianas directas de FurA encontradas en este trabajo se corresponden con reguladores transcripcionales: *all2080*, *all1651*, *all3903* y *alr2595*. El gen *all2080* codifica para la proteína CyA1043, regulador transcripcional de la familia AbrB. Este gen está implicado en numerosos procesos fisiológicos tales como el metabolismo del nitrógeno, la producción de toxinas, la fotosíntesis o el estrés oxidativo (30). El regulador transcripcional codificado por el gen *all3903* pertenece a la familia ArsR, formada por represores transcripcionales metalorreguladores que participan en la respuesta a estreses por metales pesados. Los reguladores de esta familia se unen de manera específica al promotor diana y se disocian de él en presencia de metales, permitiendo así la expresión de los genes implicados en la detoxificación o eflujo de iones metálicos (31). En cuanto a *alr2595* y *all1651* codifican para dos reguladores transcripcionales de tipo AraC, una familia de activadores transcripcionales ampliamente distribuidos que tienen en común tres funciones reguladoras: metabolismo del carbono, respuesta a estreses y patogénesis (32).

El resto de las dianas de FurA corresponden a sistemas de dos componentes o proteínas relacionadas. El gen *sixA* (*alr0221*) codifica para una fosfohistidina fosfatasa cuya función se desconoce en *Anabaena* sp. PCC7120. Sin embargo, su ortólogo en *E. coli* está implicado en la transferencia de fosfato de ArcB, una histidina quinasa híbrida que permite a la bacteria adaptarse a situaciones de anaerobiosis (33). Por otro lado, el gen *alr1308* codifica para una histidina quinasa con un dominio GAF. Los dominios GAF unen cAMP y cGMP y están asociados con la regulación génica, detección de luz, señalización en los fitocromos, fijación de nitrógeno, control de las adenil ciclasas y de las histidinas quininas de dos componentes (34). Los genes *rpaA* (*all0129*), *all7584*, *alr0072* y *all3348* son reguladores de respuesta de la familia CheY, caracterizada por estar implicada en la quimiotaxis. Además, hay dos genes que codifican para sistemas híbridos de dos componentes, *alr3442* y *all1804*, con diversos dominios PAS. Los dominios PAS son muy comunes en las histidinas quininas de los sistemas de dos componentes, así como en los sistemas híbridos; estos dominios están relacionados con multitud de funciones biológicas, entre ellas principalmente sensor el potencial

redox, el oxígeno, la energía celular o la luz (35). Los dominios GAF y PAS tienen plegamientos similares y están relacionados evolutivamente entre ellos, de hecho muchas veces aparecen simultáneamente en proteínas implicadas en rutas de señalización y sensoriales (36).

Finalmente *pknE* (*alr3732*) y *pknD* (*alr4368*) son dos serin-treonin quinasas. PknE es requerida en *Anabaena* sp. PCC7120 para el desarrollo normal de la morfología de las células vegetativas, el control de la división celular y el desarrollo de los heterocistos. De hecho su expresión aumenta en estas células y regula la actividad del regulón de HetR, regulador transcripcional importante en la diferenciación temprana de los heterocistos (37). PknD está implicada en la regulación del metabolismo de nitrógeno en condiciones de fijación de nitrógeno y en el transporte de nitrógeno desde los heterocistos hasta las células vegetativas (38).

A través de este trabajo se han identificado reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes regulados directamente por FurA, y que son mediadores en las redes de regulación mediadas por FurA. Algunas de estas proteínas reguladoras están relacionadas con la respuesta a estreses, lo que correlaciona con la función ya descrita de FurA de regulador clave en estreses abióticos. También se han identificado dianas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno como las dos serin-treonin quinasas, PknE y PknD.

6.2 Red de regulación mediada por FurB

FurB es el regulador transcripcional por excelencia de la homeostasis de zinc, reprime genes diana en presencia de suficiente zinc, e induce metalochaperonas y sistemas de transporte de adquisición de zinc para hacer frente a la deficiencia de este metal (5). Además, también se ha descrito su implicación en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo, uniéndose al DNA para protegerlo de este estrés y regulando la expresión de la catalasa *alr0998*, la peroxidasa *sodA* y la peroxirredoxina *gct3* (25, 26).

En este estudio, con el objetivo de describir redes de regulación medidas por FurB, se han estudiado genes con funciones reguladoras pueden ser potencialmente diana de esta proteína. Tras los ensayos de retardo en gel se ha observado que los genes *alr0900*, *all5210*, *all7584*, *alr0072* y *orrA* (*alr3768*) son regulados de manera directa por FurB, sin embargo no se observó la formación de complejo con los genes *alr7219*, *alr0428* y *all4986*, a pesar de que sí mostraron expresión diferencial en el transcriptoma de sobreexpresión de FurB, por lo que es probable que estos genes sean regulados por FurB pero de manera indirecta a través de otros reguladores transcripcionales localizados jerárquicamente por debajo de FurB o también puede deberse a efectos compensatorios.

El gen *alr0900* codifica para una serin-treonin quinasa con un dominio sensor mientras que los genes *all7584* y *alr0072*, como ya se ha comentado anteriormente, codifican para reguladores transcripcionales de la familia CheY. La proteína OrrA, codificada por el gen *alr3768*, se encarga en *Anabaena* sp. PCC7120 del control de la síntesis de sucrosa, la cual se acumula en situaciones de estrés salino (39) y es un regulador de respuesta de la familia NarL, familia caracterizada por tener un dominio de unión a DNA hélice-giro-hélice (HTH). Por último, *all5210* codifica para un sistema híbrido de dos componentes involucrado en la percepción y transducción de señales de baja temperatura; es una proteína con cuatro dominios PAS y tres GAF que hacen la función de sensores, y un módulo de respuesta formado por un dominio histidina quinasa y uno regulador de respuesta (40). Nuevamente se ve la importancia de estos dominios en las proteínas reguladoras, y evidencia lo arriba mencionado de que muchas veces aparecen juntos estos dos dominios en proteínas implicadas en la señalización y respuesta a estreses.

6.3 Red de regulación mediada por FurC

En estudios anteriores se ha descrito que FurC regula de manera directa genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo, como la expresión de cuatro peroxirredoxinas involucradas en la detoxificación del H₂O₂ (27). Además recientemente se ha relacionado FurC con el metabolismo del nitrógeno, regulando genes como *hetZ* o el operón *nifHDK*, esenciales para el desarrollo de heterocistos (28). Estos datos indican que probablemente FurC sea un regulador global, cuya función no se limita únicamente al control de la respuesta frente al estrés oxidativo, por ello en este trabajo se han estudiado genes con funciones reguladoras, que contienen caja FurC en sus regiones promotoras y expresión diferencial en la estirpe de sobreexpresión de FurC, con el objetivo de establecer redes de regulación mediadas por esta proteína y obtener una visión más amplia de las funciones en las que está implicada FurC, ya sea de manera directa o indirecta. Los genes que positivos en este estudio son *asr2041*, *alr3281*, *all0345*, *all7016*, *all1651*, *alr2325*, *alr2137*, *all3788* y *alr0264*; los seis primeros codifican para reguladores transcripcionales, mientras que los tres últimos para sistemas de dos componentes.

La búsqueda bioinformática no ha permitido obtener información funcional acerca del gen *asr2041*, represor transcripcional de la familia XRE (xenobiotic response element), ni del *alr3281*, un regulador transcripcional. El gen *all0345* codifica para un regulador transcripcional de la familia MerR, cuyos miembros responden a estímulos ambientales como metales pesados, estrés oxidativo o antibióticos (41). Tanto la familia XRE como MerR se caracterizan por presentar un dominio de unión a DNA de tipo hélice-giro-hélice (HTH) en el N-terminal. Por su parte, el gen *all7016* codifica para un regulador transcripcional que pertenece a la familia LuxR que se caracteriza por tener un dominio de unión a DNA HTH en el extremo C-terminal, mientras que en el N-terminal contiene un dominio de respuesta regulatorio, que en el caso de la proteína All7016 se trata de un dominio GAF de unión a hemo (42). Los reguladores LuxR generalmente son activadores, pero algunos pueden ser represores o incluso tener una actividad dual en función del sitio al que se unan, participan en una gran variedad de procesos biológicos tales como Quorum Sensing y la expresión de genes de factores de virulencia, movilidad o formación de biofilms entre otros (43). FurC también regula directamente al gen *all1651*, que como se ha comentado anteriormente es un regulador transcripcional de la familia AraC, caracterizada por estar implicada en el metabolismo del carbono, respuesta a estreses y patogénesis (32). El gen *alr2325*, que es un regulador transcripcional de la familia de proteínas receptoras de cAMP (CRP), se corresponde con la proteína AnCrpB que parece funcionar cuando los niveles de cAMP son muy elevados (44). AnCrpB contiene un dominio de unión cNMP lo que le permite unirse tanto a cAMP como a cGMP, aunque a este último más débilmente (44) y es un activador transcripcional que regula los genes inducidos por agotamiento de nitrógeno. De hecho, se ha sugerido la posibilidad de que se trate de una proteína necesaria para la reanudación del metabolismo del nitrógeno, del carbono inorgánico y de la actividad fotosintética durante la rehidratación (45).

En cuanto a los sistemas de dos componentes, FurC mostró ser capaz de unirse a la región promotora del gen *alr2137* que codifica para una histidina quinasa de membrana de un sistema de dos componentes de tipo NarL. Esta histidina quinasa también contiene diversos dominios PAS y GAF. El gen *all3788* da lugar a un regulador de respuesta de dos componentes de la familia OmpR. Este gen muestra un aumento de expresión en una situación de privación de nitrógeno (46), además sólo se han encontrado ortólogos en cianobacterias formadoras de heterocistos, lo que puede indicar que su función esté relacionada con el desarrollo de estas estructuras (46). Finalmente el gen *alr0264* codifica para un regulador de respuesta de tipo CheY de un sistema de dos componentes.

Muchas de las proteínas reguladoras que han salido diana en este trabajo están relacionadas con funciones ya anteriormente descritas para FurC, como por ejemplo las proteínas AnCrpB o All3788 relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, o All0345 que pertenece a una familia de reguladores implicada en el estrés oxidativo. Sin embargo, algunas de estas dianas también introducen nuevas funciones en las que puede estar implicado potencialmente FurC de manera indirecta a través de estas proteínas reguladoras, retomando de nuevo la idea de que se trata de un regulador global, como por ejemplo la proteína All7016 perteneciente a una familia implicada en una gran diversidad de procesos biológicos como la formación de biofilms o la movilidad.

6.4 FurC responde a las señales de estrés oxidativo y de deficiencia de nitrógeno de manera independiente

Con el objetivo de entender cómo FurC es capaz de responder a dos estreses: estrés oxidativo y deficiencia de nitrógeno, se han estudiado la expresión mediante Real Time RT-PCR de genes diana de FurC en ambas situaciones de estrés en la estirpe de sobreexpresión de FurC (EB2770FurC) con respecto a la silvestre.

En condiciones normales, en la estirpe EB2770FurC la expresión de *prxA*, gen implicado en la respuesta a estrés oxidativo, se encuentra 4 veces más reprimida que en la estirpe silvestre, algo que cabía esperar puesto que FurC funciona como represor. En situación de estrés oxidativo los niveles de mRNA de *prxA* aumentan porque FurC se libera del DNA y deja de reprimir la expresión, lo que concuerda con el modelo de actuación de FurC (9). En cambio, en situación de deficiencia de nitrógeno no se observa desrepresión de *prxA*, lo que sugiere que la deficiencia de nitrógeno no afecta a la expresión de este gen.

En cuanto al comportamiento de *hetZ*, gen implicado en la diferenciación del heterocisto, en condiciones normales no presenta cambio de expresión, mientras que en deficiencia de nitrógeno su expresión aumenta 8 veces en la estirpe de sobreexpresión con respecto a la silvestre, lo cual es lógico, ya que este gen es activado por FurC en ausencia de nitrógeno (28). En condiciones de estrés oxidativo también se produce un aumento pero es mucho menor, lo que indica que la señal que desencadena el aumento de expresión es la deficiencia de nitrógeno, y no el estrés oxidativo.

Ambos resultados muestran que FurC responde de manera independiente al estrés oxidativo y al déficit de nitrógeno, de manera que no todas las dianas de esta proteína cambian su expresión de la misma manera en respuesta a ambas señales. El mecanismo por el que FurC lleva a cabo esta regulación se estudiará en futuras investigaciones.

Teniendo en cuenta esta información se seleccionaron dos dianas de FurC identificadas en este trabajo (*alr2137* y *alr2325*) para estudiar su cambio de expresión frente a los dos estreses. En condiciones de deficiencia de nitrógeno no se observa apenas cambio de expresión en ninguno de los dos reguladores transcripcionales, en cambio en situación de estrés oxidativo sí se produce represión en ambos genes. Esto lleva a pensar que estos genes están regulados por el estrés oxidativo y no el déficit de nitrógeno. Además, en la estirpe EB2770FurC respecto a la estirpe silvestre, en condiciones normales, en ambos genes se produce un aumento de la expresión, lo que indica que probablemente FurC esté funcionando como un activador.

7. Conclusiones

Tras realizar los estudios que componen este Trabajo de Fin de Grado se obtienen las siguientes conclusiones:

- La combinación del análisis de perfiles transcriptómicos de estirpes de desregulación de parálogos FUR y el estudio de la presencia de cajas FUR en regiones promotoras han permitido identificar genes con funciones reguladoras regulados de manera directa por las proteínas FUR en *Anabaena* sp. PCC7120.
- Las proteínas FUR regulan de forma directa diversos genes de reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes. En concreto, se han identificado 14 dianas directas para FurA, 5 para FurB y 9 para FurC, lo que ha permitido describir redes de regulación en *Anabaena* sp. PCC7120 mediadas por las proteínas FUR.
- Los tres parálogos FUR de *Anabaena* sp. PCC7120 son capaces de unirse a sus propias regiones promotoras, así como a las regiones promotoras de los otros parálogos FUR, evidenciado que estas redes de regulación están interconectadas.
- Las señales de estrés oxidativo y deficiencia de nitrógeno actúan de manera independiente sobre FurC, desencadenando la expresión de distintos genes dentro de su regulón.

7. Conclusions

After finishing the studies that form this Final Degree Project, the following conclusions have been obtained:

- The combination of the analysis of transcriptomic profiles of deregulation strains of FUR paralogs and the study of the presence of FUR boxes in promoter regions has allowed the identification of genes with regulatory functions that are potentially directly regulated by the FUR proteins in *Anabaena* sp. PCC7120.
- FUR proteins directly regulate various transcriptional regulators and two component systems. Specifically, 14 direct targets have been identified for FurA, 5 for FurB and 9 for FurC, which has allowed to describe regulatory networks in *Anabaena* sp. PCC7120 performed by FUR proteins.
- The three FUR paralogs of *Anabaena* sp. PCC7120 are able to bind to their own promoter region, as well as to the promoter regions of the other FUR paralogs, showing that these regulatory networks are interconnected.
- Oxidative stress and nitrogen deficiency signals act independently on FurC, triggering the expression of different genes within its regulon.

Bibliografía

1. Veaudor T, Blanc-Garin V, Chenebault C, Diaz-Santos E, Sassi J-F, Cassier-Chauvat C, *et al.* Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Life*. 2020;10(5):71.
2. Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics*. 2012;13(1):56.
3. Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(8):471-83.
4. Rachedi R, Foglino M, Latifi A. Stress Signaling in Cyanobacteria: A Mechanistic Overview. *Life*. 2020;10(12).
5. Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol*. 2012;194(10):2426.
6. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014;546:41-52.
7. Latifi A, Ruiz M, Zhang C-C. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(2):258-78.
8. Imlay JA. Pathways of Oxidative Damage. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):395-418.
9. Yingping F, Lemeille S, Talla E, Janicki A, Denis Y, Zhang C-C, *et al.* Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Env Microbiol Rep*. 2014;6(5):468-75.
10. Schwarz R, Forchhammer K. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology*. 2005;151(8):2503-14.
11. Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. Cyanobacterial heterocysts. *CSH Perspect Biol*. 2010;2(4):a000315-a.
12. Esteves-Ferreira AA, Inaba M, Fort A, Araújo WL, Sulpice R. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):541-60.
13. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annu Rev Biochem*. 2000;69(1):183-215.
14. Ashby MK, Houmard J. Cyanobacterial Two-Component Proteins: Structure, Diversity, Distribution, and Evolution. *Microbiol Mol Biol R*. 2006;70(2):472.
15. Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol*. 2016;70(1):103-24.
16. Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, *et al.* The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol Mol Biol R*. 2005;69(2):326.
17. Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three *fur* homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;236(2):275-82.
18. Hernández JA, López-Gomollón S, Muro-Pastor A, Valladares A, Bes MT, Peleato ML, *et al.* Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: A Reducing Environment and the Presence of Mn²⁺ are Positive Effectors in the Binding to *isiB* and *furA* Promoters. *Biometals*. 2006;19(3):259-68.
19. González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151384.
20. González A, Bes MT, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF. FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol*. 2012;14(12):3175-87.
21. López-Gomollón S, Hernández JA, Wolk CP, Peleato ML, Fillat MF. Expression of *furA* is modulated by NtcA and strongly enhanced in heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*. 2007;153(1):42-50.
22. González A, Valladares A, Peleato ML, Fillat MF. FurA influences heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett*. 2013;587(16):2682-90.
23. Guío J, Sarasa-Buisan C, Velázquez-Campoy A, Bes MT, Fillat MF, *et al.* 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett*. 2020;594(2):278-89.

24. Mills DA, Schmidt B, Hiser C, Westley E, Ferguson-Miller S. Membrane Potential-controlled Inhibition of Cytochrome c Oxidase by Zinc. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14894-901.
25. Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, *et al*. Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol*. 2015;17(6):2006-17.
26. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J*. 2009;418(1):201-7.
27. Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, *et al*. Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell Physiol*. 2019;60(8):1778-89.
28. Sarasa-Buisan C, Guio J, Broset E, Peleato ML, Fillat MF, Sevilla E. FurC (PerR) from *Anabaena* sp. PCC7120: a versatile transcriptional regulator engaged in the regulatory network of heterocyst development and nitrogen fixation. *Environ Microbiol*. 2021;00(00):00-00.
29. Gonzalez A, Angarica VE, Sancho J, Fillat MF. The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: in silico prediction and experimental validation of novel target genes. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(8):4833-46.
30. Larsson J, Nylander JAA, Bergman B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol Biol*. 2011;11(1):187.
31. Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):131-43.
32. Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol R*. 1997;61(4):393-410.
33. Matsubara M, Mizuno T. The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 2000;470(2):118-24.
34. Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH. Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Mol Pharmacol*. 2004;65(2):267.
35. Taylor Barry L, Zhulin Igor B. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol R*. 1999;63(2):479-506.
36. Ho Y-SJ, Burden LM, Hurley JH. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J*. 2000;19(20):5288-99.
37. Saha SK, Golden JW. Overexpression of *pknE* Blocks Heterocyst Development in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol*. 2011;193(10):2619.
38. Zhang CC, Libs L. Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Mol Gen Genet*. 1998;258(1):26-33.
39. Ehira S, Kimura S, Miyazaki S, Ohmori M. Sucrose synthesis in the nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is controlled by the two-component response regulator OrrA. *Appl Environ Microb*. 2014;80(18):5672-9.
40. Ehira S, Ohmori M, Sato N. Identification of Low-temperature-regulated ORFs in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120: Distinguishing the Effects of Low Temperature from the Effects of Photosystem II Excitation Pressure. *Plant Cell Physiol*. 2005;46(8):1237-45.
41. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):145-63.
42. Tang K, Knipp M, Liu B-B, Cox N, Stabel R, He Q, *et al*. Redox-dependent Ligand Switching in a Sensory Heme-binding GAF Domain of the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC7120. *J Biol Chem*. 2015;290(31):19067-80.
43. Chen J, Xie J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *J Cell Biochem*. 2011;112(10):2694-702.
44. Suzuki T, Yoshimura H, Hisabori T, Ohmori M. Two cAMP receptor proteins with different biochemical properties in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett*. 2004;571(1-3):154-60.
45. Higo A, Suzuki T, Ikeuchi M, Ohmori M. Dynamic transcriptional changes in response to rehydration in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology*. 2007;153(11):3685-94.
46. Ehira S, Ohmori M. NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Microbiol*. 2006;59(6):1692-703.

**MATERIAL
SUPLMENTARIO**

9. Material Suplementario

9.1 Programa utilizado para las PCR

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

La temperatura de hibridación (T_m) dependió de la pareja de oligonucleótidos empleados, siendo siempre 2 °C inferior a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. En la sección 9.2 de Material Suplementario se detalla tanto la T_m como la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

9.2 Cebadores para la amplificación de promotores mediante PCR

Los primers empleados para amplificar las regiones promotoras de los genes de interés fueron suministrados por Invitrogen o Biomers. Las secuencias de las regiones promotoras se obtuvieron a partir de la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>).

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Secuencia amplificada
<i>Pall7584</i> up	TATAGCGTCAAACCTCGAATATG	58	Promotor del gen <i>all7584</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall7584</i> dw	CTTCGACTAGTAACACTCTCA		
<i>Pall1651</i> up	GAAACCCGTCCAACGCAGTG	60	Promotor del gen <i>all1651</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall1651</i> dw	GCTGCATATAGTGTTAATTTAGG		
<i>Pall1804</i> up	GAGATTAGCTAGTATTGCTCC	58	Promotor del gen <i>all1804</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall1804</i> dw	AAATAGCCTCTTAGATGGTTAC		
<i>Palr2595</i> up	GTATTGACGAAACCGGAAGG	58	Promotor del gen <i>alr2595</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr2595</i> dw	TTCTTGTAACAACAAGGGTCATG		
<i>Pall3903</i> up	CAAGTCTGCAATCAAATAAGTG	58	Promotor del gen <i>all3903</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall3903</i> dw	CAGATTTAAGCGCACACAATAC		
<i>Pall3564</i> up	TGAGCCATTACTTTATCTTGAC	58	Promotor del gen <i>all3564</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall3564</i> dw	ACTTTCACGGTTTTTGCAGAG		
<i>Palr0072</i> up	GACGTAAATCAGGCATAGACG	60	Promotor del gen <i>alr0072</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr0072</i> dw	AGCCAGCTTCCGATAAGATAC		
<i>Pall3348</i> up	AACAATAACACAGAGATATGGTG	60	Promotor del gen <i>all3348</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall3348</i> dw	ACAGATTCGTGATCATCAATTAC		
<i>Palr3442</i> up	GAAGCGGTAGGAGCATAAAC	58	Promotor del gen <i>alr3442</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr3442</i> dw	CTGTTAATTCATCAGCAAGTTC		
<i>Pall1704</i> up	CAAATACCCTACGGGAAGC	58	Promotor del gen <i>all1704</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall1704</i> dw	GCGCAATCCGAATTTTATTCAT		
<i>Palr1308</i> up	GCTCTTAGAGATGATGAACTG	58	Promotor del gen <i>alr1308</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr1308</i> dw	GAGGAAATCTATTTGGTAATTGG		
<i>PabrB</i> up	CATTTTGTTAGTTGTCAATTGTC	58	Promotor del gen <i>abrB</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PabrB</i> dw	CTGTTTAGGCATCAACTTAGG		
<i>PsixA</i> up	CAAGAATTATATGCAATCGCATG	60	Promotor del gen <i>sixA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PsixA</i> dw	TGCTTCAGCGATGCCATGAC		
<i>PpknE</i> up	AGTGAACCCGTAGATCCACG	58	Promotor del gen <i>pknE</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PpknE</i> dw	TTTTGAACAATTTGGTAGCGTG		
<i>PpknD</i> up	TCCACAGTCCACAGTCCAAG	60	Promotor del gen <i>pknD</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PpknD</i> dw	GAGTATCTGAATTACTTGATAGC		
<i>PrpaA</i> up	CCCCACAAAGTAGTGTAACAG	62	Promotor del gen <i>rpaA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PrpaA</i> dw	GGCTTACATCGTAGCCAGCC		
<i>PlytS</i> up	TAGCCGATTAGGAAATGCC	58	Promotor del gen <i>lytS</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PlytS</i> dw	CGACGATGAGAGAATACGCC		
<i>Pall3768</i> up	CTTACTTTCATAAAGTTGAC	52	Promotor del gen <i>all3768</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall3768</i> dw	GAGTGAGTGTAACGATGAGTG		
<i>Palr0900</i> up	AGAAGCATCAGCCGCTATAC	58	Promotor del gen <i>alr0900</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr0900</i> dw	TCCAGACAGCAAACGGTTG		
<i>Palr7219</i> up	GATTTGCAATCAACGATATTCC	58	Promotor del gen <i>alr7219</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr7219</i> dw	TCGGATTAATTCCTCATCCTC		
<i>Pall4986</i> up	TACTCATAGGATCAATAGCGG	58	Promotor del gen <i>all4986</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall4986</i> dw	CTCAAATGCTCTAAGCTTAAAG		
<i>Pall5210</i> up	CTGCATAAGTGTTAACAGTTAC	58	Promotor del gen <i>all5210</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall5210</i> dw	CAGAAATAGGAATATTAGGCATG		

<i>Palr0428</i> up	CCATATTAGATTCCTGAGTGAG	58	Promotor del gen <i>alr0428</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr0428</i> dw	ATTGTTGATCAGGTAATGGGC		
<i>Pall0345</i> up	GATATAACTTGGCAAACGCCTG	60	Promotor del gen <i>all0345</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall0345</i> dw	TGAAGACAAACGACTTTCTCAC		
<i>Pasr2041</i> up	GATGATAATGGATCACAGGATG	58	Promotor del gen <i>asr2041</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pasr2041</i> dw	TTGACCGATTTTTGGTTGTGC		
<i>Palr3281</i> up	ATCACAGGTGTATCCTTGGG	58	Promotor del gen <i>alr3281</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr3281</i> dw	CAAAGCGATCGCGCTTCAC		
<i>Palr2137</i> up	GATGTTTGACCAATTGGTGGC	58	Promotor del gen <i>alr2137</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr2137</i> dw	GAGCGGTAGGCTCAAAAGC		
<i>Palr2325</i> up	CTGGTTAACACTTGTCTAATTAG	58	Promotor del gen <i>alr2325</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr2325</i> dw	GTGGCTGTACTCAATAAGGG		
<i>Pall1071</i> up	GTTAAGTGTCTCGAATTGATGG	60	Promotor del gen <i>all1071</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall1071</i> dw	AATTTTCGCGGTTCGGTGAGAC		
<i>Pall3788</i> up	GCACGTAAGCAGAAAGACATAC	62	Promotor del gen <i>all3788</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall3788</i> dw	GATATATGAGGTTACGGACTCC		
<i>Pall5323</i> up	GGAGAGACAAGCAAGACTCG	60	Promotor del gen <i>all5323</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall5323</i> dw	GCCATAGCTTGAGCCAGCAG		
<i>Palr0264</i> up	TAGGCAAAGGTAACCTTTAGTTG	58	Promotor del gen <i>alr0264</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Palr0264</i> dw	GCTGCTGAGAGTAGTGCTTC		
<i>Pall7016</i> up	GTACATATACACCCAGACCAAG	58	Promotor del gen <i>all7016</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall7016</i> dw	GTAGTTCATGCTCACTAGGG		
<i>PfurA</i> up	CTCGCCTAGCAATTTACAAC	56	Promotor del gen <i>furA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PfurA</i> dw	GCCTTGAGCGAAGTATTTGTG		
<i>PfurB</i> up	CTTACTTATTGCCCGATCCC	56	Promotor del gen <i>furB</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PfurB</i> dw	GCGTATGGCTCTCATAGAC		
<i>PfurC</i> up	CATTGTCATCGGTCATTAGA	56	Promotor del gen <i>furC</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PfurC</i> dw	GCCTGTTGCTGCATATTTATG		
<i>PisiB</i> up	GTCGCACTCACTTTCGTTAC	54	Promotor del gen <i>isiB</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PisiB</i> dw	CCGTAGAATAAACCAATTTTC		
<i>PnifJ</i> up	GCCTACTCTGCGAGTTCTCCG	66	Promotor del gen <i>nifJ</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PnifJ</i> dw	GGCCTGTGAGAGTTGCTGCAC		
<i>Pall4725</i> F	CTCCGGTGGCACAGGTATTGGC	70	Promotor del gen <i>all4725</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>Pall4725</i> R	CAGTGTTGCAGTCCGACGCAACCG		
<i>PhetZ</i> up	GCGTTTAGTTTATCCGCAA	60	Promotor del gen <i>hetZ</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
<i>PhetZ</i> dw	CTCAAGCATTGTTGTAGCCG		

Tabla S-1. Cebadores utilizados para amplificar mediante PCR la región promotora de los genes de interés para los EMSA

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

El programa utilizado para determinar el cambio en la expresión génica fue “QuantStudio Real-Time PCR software” (ThermoFisher). Con el CT que recoge el programa se realizan una serie de cálculos matemáticos y se determina así la variación en la expresión de los genes de estudio. Los cálculos llevados a cabo fueron:

- Cálculo de la media de las réplicas técnicas.
- Cálculo de $\Delta CT = CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen housekeeping}$
- Cálculo de $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ muestra tratada} - \Delta CT \text{ muestra control}$
- $Foldchange = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (en caso de que el valor obtenido sea menor que uno, se calcula el inverso y se cambia de signo). Con esto se obtiene la variación de la expresión del gen de interés con respecto al gen housekeeping, *rpnB*.

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

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

9.4 Cebadores utilizados en los ensayos de Real Time RT-PCR

Cebador	Secuencia 5'→3'	Secuencia amplificada
<i>PprxA</i> for	CCATCACCTACGGAACACAAGA	Promotor del gen <i>prxA</i> de Anabaena sp. PCC7120
<i>PprxA</i> rev	TCCTGATCAACTACAGCTGTTGCT	
<i>PhetZ</i> up	CTGCGGGGCGCAAACCTT	Promotor del gen <i>hetZ</i> de Anabaena sp. PCC7120
<i>PhetZ</i> dw	CGGCGGCTTGTTTCGATAT	
<i>Palr2137</i> up	GCGCGAGGTCGGTCAA	Promotor del gen <i>all2137</i> de Anabaena sp. PCC7120
<i>Palr2137</i> dw	CGCCCCAGCGATCGT	
<i>Palr2325</i> up	GGCGCACCTGTGGAGATG	Promotor del gen <i>alr2325</i> de Anabaena sp. PCC7120
<i>Palr2325</i> dw	CCAAAAAATCACCCCTTCCTA	

Tabla S-3. Cebadores utilizados para la Real Time RT-PCR

9.5 Imágenes de los geles SDS-PAGE tras pasar por la columna de Heparina y la de DEAE-Celulosa

La proteína FurC de *Anabaena* sp. PCC7120 se purificó mediante dos pasos. El primero consistió en una cromatografía de afinidad de Heparina. Tras finalizar la purificación se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna de purificación para determinar en cuales se encontraba la proteína de interés (figura S-1). En este caso las fracciones seleccionadas fueron las fracciones 45-65, que se combinaron y se dializaron.

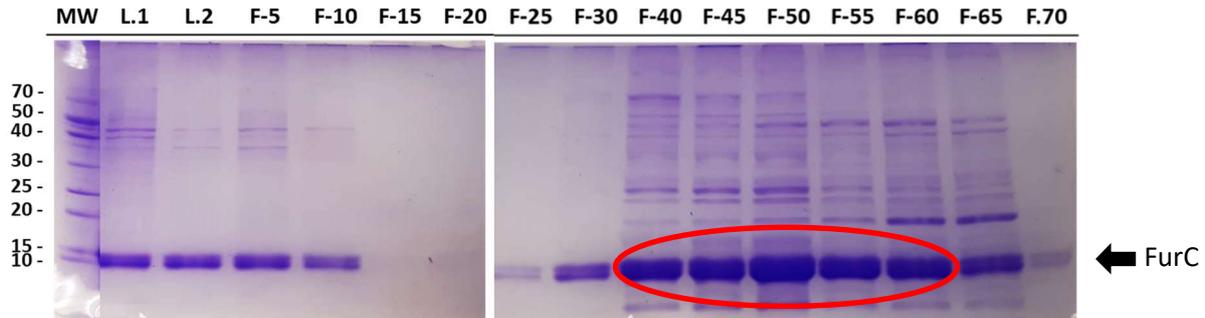


Figura S-1. Imagen del gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas tras el paso por la columna de Heparina teñidas con azul de Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular (MW) en kDa. Las siguientes tres columnas son el escurrido de lavado con las proteínas que no interaccionan con la columna y el resto de carriles contienen las diferentes fracciones de la purificación. Rodeadas en rojo están las fracciones seleccionadas para pasar por la columna DEAE-Celulosa.

Tras la diálisis se realizó un segundo paso de purificación por DEAE-celulosa y se realizó un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas (figura S-2). En este caso las fracciones seleccionadas fueron las fracciones 35-40, que se combinaron y se dializaron.

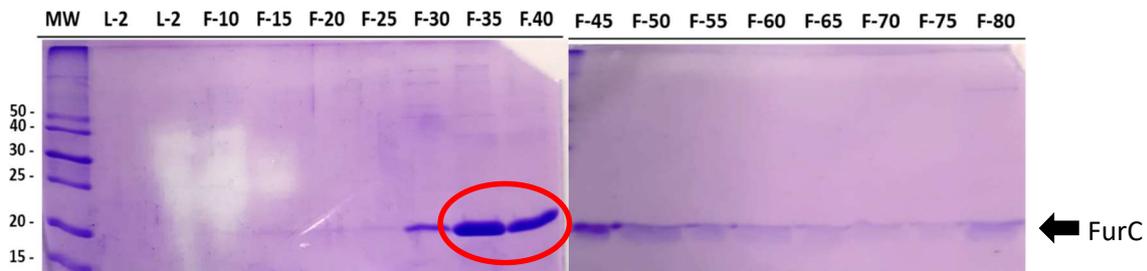


Figura S-2. Imagen del gel SDS-PAGE de las fracciones eluidas tras el paso por la columna de DEAE-Celulosa teñidas con azul de Coomassie. El primer carril contiene el marcador de peso molecular (MW) en kDa y el resto de carriles contienen las diferentes fracciones de la purificación.

9.6 Composición de los °geles SDS-PAGE

Los geles están formados por una región separadora al 17% de acrilamida/bisacrilamida y una región concentradora al 5%

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

Tabla S-4. Composición de los geles desnaturalizantes SDS-PAGE

9.7 Composición de los geles de EMSA

Reactivo	Volumen	
	FurC	FurA y FurB
Agua miliQ	5,79 mL	5,79 mL
Acrilamida 30% (p/v)	2 mL	2 mL
Runing Buffer 10x (30,28 g/L Tris-HCl, 142 g/L glicina, pH 8,5)	0,93 mL	0,93 mL
Glicerol 50%	1,4 mL	1,4 mL
MnCl ₂	10 µL	-
PSA 10% (p/v)	50 µL	50 µL
TEMED	30 µL	30 µL

Tabla S-5. Composición de los geles de EMSA para FurA, FurB y FurC

9.8 Matrices de peso empleadas para la búsqueda de cajas FUR

9.8.1 Matriz de peso de la caja de FurB

0.333333 0.266667 0.266667 0.133333
0.666667 0.066667 0.066667 0.200000
0.266667 0.000000 0.266667 0.466667
0.333333 0.200000 0.133333 0.333333
0.600000 0.200000 0.133333 0.066667
0.000000 0.000000 0.000000 1.000000
0.066667 0.000000 0.933333 0.000000
0.933333 0.000000 0.000000 0.066667
0.066667 0.000000 0.066667 0.866667
0.933333 0.000000 0.000000 0.066667
0.933333 0.000000 0.000000 0.066667
0.000000 0.200000 0.000000 0.800000
0.133333 0.333333 0.400000 0.133333
0.866667 0.000000 0.066667 0.066667
0.066667 0.000000 0.000000 0.933333
0.200000 0.000000 0.000000 0.800000
0.733333 0.133333 0.066667 0.066667
0.000000 0.066667 0.000000 0.933333
0.133333 0.800000 0.000000 0.066667
0.800000 0.066667 0.066667 0.066667
0.533333 0.000000 0.133333 0.333333
0.400000 0.066667 0.066667 0.466667
0.666667 0.133333 0.000000 0.200000
0.400000 0.133333 0.066667 0.400000
0.400000 0.200000 0.133333 0.266667

9.8.2 Matriz de peso de la caja de FurC

0.111111 0.500000 0.000000 0.388889
0.666667 0.000000 0.222222 0.111111
0.777778 0.000000 0.000000 0.222222
0.666667 0.166667 0.055556 0.111111
0.444444 0.222222 0.333333 0.000000
0.000000 0.000000 0.111111 0.888889
0.000000 0.944444 0.055556 0.000000
1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
0.333333 0.000000 0.000000 0.666667
0.500000 0.111111 0.166667 0.222222
0.888889 0.055556 0.000000 0.055556
0.166667 0.611111 0.000000 0.222222
0.333333 0.166667 0.444444 0.055556
1.000000 0.000000 0.000000 0.000000
0.166667 0.388889 0.222222 0.222222
0.277778 0.000000 0.000000 0.722222
0.222222 0.111111 0.055556 0.611111
0.000000 0.166667 0.055556 0.777778
0.277778 0.000000 0.722222 0.000000