



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

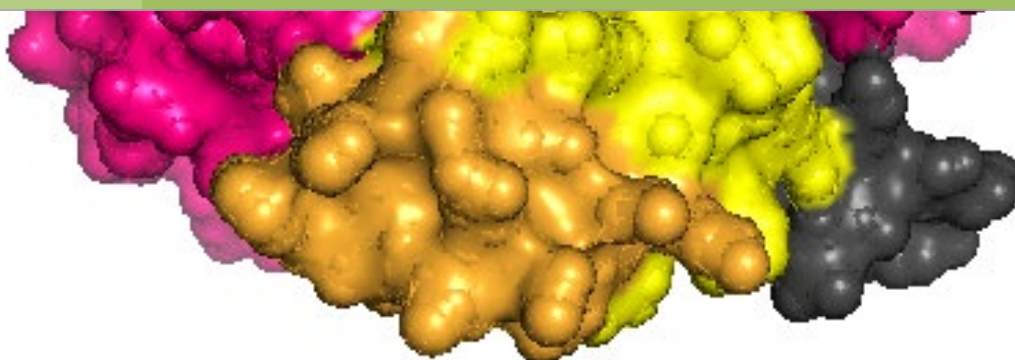
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Ciencias



TRABAJO
DE FIN DE
GRADO

*PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL
REGULADOR TRANSCRIPCIONAL All7016 DE LA
CIANOBACTERIA ANABAENA SP. PCC7120*



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Alumna: Ángela Guiomar Estaún Allué
Directores: Dra. María Teresa Bes Fustero
Jorge Guío Martínez

Curso 2023/2024

*Purificación y caracterización del
regulador transcripcional All7016 de la
cianobacteria Anabaena sp. PCC7120*

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Trabajo de Fin de Grado para optar al título de Graduado en
Biotecnología

Alumna: Ángela Guiomar Estaún Allué

Directores: Dra. María Teresa Bes Fustero

Jorge Guío Martínez

Curso 2022/2023

Agradecimientos

Quiero empezar este trabajo dando las gracias a todas aquellas personas que han lo han hecho posible, tanto por su ayuda en el mismo, como por su apoyo y compañía a lo largo de los 4 años de carrera.

Primero a Jorge, por su paciencia y su compromiso con la ciencia y nuestra enseñanza, haciendo de este trabajo una experiencia tan positiva y formativa.

A la doctora María Teresa Bes, por su colaboración, consejo y tiempo implicado en los diferentes paso de la elaboración de este proyecto.

A mi compañero de laboratorio Gabriel, por compartir su tiempo y esfuerzo conmigo, creando un equipo sin el que no habría sido posible llegar a todo.

A mi madre Teresa, mi padre Pedro y mi hermana María, porque sin ellos no habría llegado a primero de carrera, y mucho menos a terminar un trabajo de fin de grado.

Y por último a todos mis amigos, por darle sentido a esta vida, y en especial a Marina y Karinna, por ser lo mejor que he podido llevarme de esta carrera.

Índice

1. Resumen/Abstract	1
1.1. Resumen	1
1.2. Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Las cianobacterias	2
2.2. Homeostasis de metales en cianobacterias: las proteínas FUR	3
2.2.1. FurA	4
2.2.2. FurB	4
2.2.3. FurC	4
2.3. Redes de regulación en <i>Anabaena sp.</i> PCC7120	5
3. Objetivos	6
4. Materiales y Métodos	6
4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	6
4.1.1. Cepas de <i>E. coli</i>	6
4.1.2. Condiciones de cultivo	6
4.2. Aislamiento y análisis de DNA	7
4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	7
4.2.2. Electroforesis del DNA	7
4.2.3. Purificación y cuantificación de productos de PCR	7
4.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes	7
4.3.1. Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	8
4.3.2. Prueba de sobreexpresión a pequeña escala	8
4.3.3. Prueba de solubilización	8
4.4. Producción de proteínas recombinantes	9
4.4.1. Obtención de biomasa	9
4.4.2. Rotura celular	10
4.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad de unión a metales	10
4.5. Técnicas analíticas de proteínas	11
4.5.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	11
4.5.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida	11
4.5.3. Cuantificación de las proteínas por espectroscopía	11
4.6. Ensayos de Movilidad Electroforética (EMSA)	12
4.7. Técnicas bioinformáticas	12
5. Resultados	13
5.1. Análisis bioinformático del regulador All7016	13
5.2. Prueba de sobreexpresión	16
5.3. Análisis de la solubilización empleando diferentes tampones	16
5.4. Purificación con cloruro de guanidinio	17
5.5. Análisis de la solubilización empleando diferentes estirpes y condiciones de cultivo	18
5.6. Purificación a partir de biomasa generada en la estirpe pG-KJE8	18
5.7. Estudio de unión al DNA mediante ensayos de retardo en gel	20
6. Discusión	21
6.1. Análisis bioinformático del regulador All7016	21

6.2. Sobreexpresión y purificación del regulador All7016.....	21
6.3. Optimización y purificación del regulador All7016.....	22
6.4. Optimización de las condiciones de unión al DNA del regulador All7016.....	23
7. Conclusiones/Conclusions.....	23
8. Bibliografía.....	24

Abreviaturas

Abs: Absorbancia

AIM: Medio de autoinducción

ATP: Adenosín trifosfato

cGMP: Monofosfato de guanosina cíclico (cyclic Guanosine MonoPhosphate)

Cys: Cisteína

C-terminal: carboxilo terminal

DNA: Ácido desoxirribonucleico (ADN)

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMSA: ensayo de retardo en gel de agarosa

FUR: Regulador de la adsorción de hierro (Ferric Uptake Regulator)

GAF: cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl ciclase and FhlA

IMAC: Cromatografía de afinidad por unión a metales (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*)

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

kDa: Kilodalton

KPi: fosfato potásico

LB: Luria-Bertani

Motivo HTH: motivo hélice – giro – hélice (helix – turn – helix)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

O/N: durante la noche (over night)

ORF: Marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

pI: Punto isoeléctrico

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA: Persulfato amónico

p/v: Reacción peso/volumen

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

TBE: Tris Borato EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

U: Unidad de actividad enzimática

UV: Ultravioleta

v/v: Relación volumen/volumen

Zur: Zinc Uptake regulator

ε: Coeficiente de extinción molar

1. Resumen / Abstract

1.1. Resumen

Para los organismos vivos algunos metales son micronutrientes minerales esenciales en el desarrollo de procesos celulares que son fundamentales para su viabilidad. En las cianobacterias la demanda de metales es excepcionalmente alta como consecuencia de su capacidad de realizar la fotosíntesis y en algunos casos de fijar nitrógeno. Sin embargo, un desequilibrio en la homeostasis de metales puede comprometer el crecimiento y supervivencia celular. Al igual que la mayoría de procariotas, las cianobacterias cuentan con reguladores de la familia FUR (Ferric Uptake Regulator) que controlan la homeostasis de metales a nivel transcripcional y regulan la expresión de otros muchos genes que pertenecen a rutas metabólicas diversas. *Anabaena* sp. PCC 7120 contiene tres parálogos FUR, denominados FurA, FurB y FurC. Estos reguladores, además de regular un gran número de genes de forma directa, se ha propuesto que podrían controlar muchos procesos celulares de forma indirecta, ya que se ha descrito que modulan la transcripción de otros reguladores transcripcionales, orquestando redes de regulación transcripcional en esta cianobacteria. Con el fin de ampliar el conocimiento de las redes de regulación mediadas por proteínas FUR, en este trabajo se ha llevado a cabo la sobreexpresión, purificación y caracterización del marco de lectura abierto All7016, anotado en las bases de datos como un regulador transcripcional, cuya transcripción está regulada por la proteína FurC. Además de realizar un estudio bioinformático para conocer sus propiedades fisicoquímicas y determinar la presencia de dominios funcionales en su secuencia de aminoácidos, se ha optimizado su sobreexpresión en *E. coli* y establecido un protocolo para su purificación. Por último, mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética se ha estudiado la capacidad de unión al DNA de la proteína purificada.

1.2. Abstract

For living organisms, some metals are essential mineral micronutrients in the development of cellular processes that are fundamental for their viability. In cyanobacteria the demand for metals is exceptionally high because of their ability to perform photosynthesis and in some cases to fix nitrogen. However, an imbalance in metal homeostasis can compromise cell growth and survival. Like most prokaryotes, cyanobacteria have regulators of the FUR (Ferric Uptake Regulator) family that control metal homeostasis at the transcriptional level and control the expression of many other genes belonging to diverse metabolic pathways. *Anabaena* sp. PCC 7120 contains three FUR paralogs, FurA, FurB and FurC. It has been proposed that, in addition to regulating a large number of genes directly, these regulators could control many cellular processes indirectly, as it has been describe that they modulate the transcription of other transcriptional regulators, orchestrating transcriptional regulatory networks in this cyanobacterium. In order to expand the knowledge of the FUR-mediated regulatory networks, in this work we have carried out the overexpression, purification and characterization of the open reading frame All7016, which was annotated as a transcriptional regulator and whose transcription is regulated by FurC. In addition to a bioinformatic study to determine its physicochemical properties and the presence of functional domains in its amino acid sequence, its overexpression in *E. coli* has been optimized and a protocol for its purification has been established. Finally, by means of electrophoretic mobility shift assays (EMSA), the DNA binding capacity of the purified protein has been studied.

2. Introducción

2.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos Gram negativos, clasificados dentro de las Eubacterias (1). Existen evidencias geológicas de que están presentes en el planeta desde la era Proterozoica, hace más de 3500 años, y se consideran responsables de transformar la atmósfera reductora a oxidante gracias a su capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica, proceso por el que liberan oxígeno al ambiente utilizando agua como donador de electrones (1). Además se ha propuesto que dieron lugar a los eucariotas fotosintéticos, gracias al proceso endosimbiótico por el que un eucariota heterotrófico fue capaz de integrar una cianobacteria, que se convertiría en el ancestro de los cloroplastos (2).

Las cianobacterias ocupan una gran variedad de nichos ecológicos, siendo capaces de colonizar un enorme rango de hábitats, desde ecosistemas terrestres a ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada. Además, estos organismos presentan una elevada capacidad de resistir y adaptarse a diferentes tipos de estreses, lo que les permite colonizar ambientes extremos, como son los lagos glaciales, aguas termales o desiertos áridos (3). Al ser muy abundantes en los ecosistemas, sobretudo en entornos marinos, las cianobacterias tienen un impacto considerable en casi todos los ciclos bioquímicos, especialmente en el ciclo del carbono, como consecuencia de la posibilidad de fijar el carbono inorgánico gracias a su actividad fotosintética (1). Además, algunas especies son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico a amonio, lo que hace que sean productoras primarias en muchos ecosistemas, especialmente en los océanos (1).

Son un grupo de microorganismos caracterizado por su gran diversidad morfológica, existiendo especies unicelulares como *Cyanothece*, filamentosas como *Anabaena* y formadoras de agrupaciones coloniales como *Microcystis*, aunque todas ellas guardan homogeneidad en cuanto a metabolismo y estructura celular (4). Las cianobacterias se caracterizan por su capacidad de llevar a cabo procesos de diferenciación celular en respuesta a estímulos del ambiente, dando lugar a diferentes tipos de células especializadas como hormogonios, filamentos de células que permiten colonizar nuevos ambientes; acinetos, formas de resistencia similares a las esporas y heterocistos, células especializadas en la fijación de nitrógeno (5).

En particular, *Anabaena sp.* PCC 7120, cianobacteria objeto de estudio en este trabajo, es una especie que puede diferenciar algunas de las células de su filamento a heterocistos en condiciones de deficiencia de nitrógeno y es la cepa modelo utilizada en estudios moleculares sobre la formación del patrón de heterocistos o los cambios morfológicos y metabólicos que tienen lugar en este tipo celular (6). Aunque se han llevado a cabo numerosos estudios que han permitido describir los mecanismos de expresión génica diferencial que gobiernan la formación del heterocisto (7), todavía existen muchas incógnitas sobre los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de estas células, lo que hace que el estudio de mecanismos de regulación génica, especialmente los relacionados con el metabolismo del nitrógeno, sean de gran interés.

Las características metabólicas de las cianobacterias, así como su gran capacidad adaptativa, han hecho crecer el interés en el estudio de estos microorganismos en el ámbito de la Biotecnología, considerándolos una fuente prometedora de biocombustibles de tercera generación y de metabolitos secundarios con interesantes propiedades farmacológicas. Asimismo, son muy interesantes sus aplicaciones en biorremediación y biofertilización debido a su naturaleza fotosintética y a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (8).

2.2. Homeostasis de metales en cianobacterias: las proteínas FUR

En las cianobacterias resulta fundamental un correcto mantenimiento de la homeostasis de micronutrientes metálicos, como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , $Cu^{1+/2+}$ o $Fe^{2+/3+}$, entre otros, ya que son componentes de moléculas esenciales para su fisiología, como en el caso de la clorofila, que contiene un átomo de magnesio en su estructura o de cofactores inorgánicos en metaloproteínas como la plastocianina, que es dependiente de cobre (9). Además, estos organismos tienen un mayor requerimiento de metales que otros procariotas no fotosintéticos, pues los fotosistemas que componen la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis, uno de sus principales procesos fisiológicos, son metaloproteínas cuya síntesis tiene una alta demanda de metales, en concreto hierro y manganeso (9). No obstante, pese a ser esenciales, la concentración de estos metales debe estar estrechamente regulada para mantener la viabilidad celular, especialmente en especies fijadoras de nitrógeno, ya que resultan tóxicos a altas concentraciones pues por ejemplo el hierro da lugar a especies reactivas de oxígeno mediante las reacciones de Fenton, ocasionando daños por estrés oxidativo (10).

Además de los fotosistemas, las enzimas implicadas en la fijación de nitrógeno contienen grupos sulfoférricos, centros P y cofactores FeMo, los cuales precisan de hierro para su biosíntesis (11), lo que hace que en especies capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno como *Anabaena* una correcta homeostasis de hierro sea fundamental para la fisiología celular.

A pesar de ser esenciales para la vida de las cianobacterias, estos metales no presentan una alta biodisponibilidad. De hecho, la deficiencia de hierro es el estrés nutricional más común en los ambientes marinos, convirtiéndose en un factor limitante en la producción primaria en los océanos. Sin embargo, las cianobacterias han desarrollado mecanismos muy finos de mantenimiento de la homeostasis de estos nutrientes basados en cambios muy precisos de la expresión de genes. Adaptan así su fisiología procariota a los cambios en el medio, de manera que se evita tanto el exceso como la deficiencia de metales (12).

El control de la homeostasis de metales en bacterias está orquestado principalmente por la superfamilia de proteínas FUR (Ferric Uptake Regulator), presentes en la mayoría de los procariotas (12). En esta familia se engloban una serie de reguladores transcripcionales que controlan la transcripción de genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis de metales, aunque se ha descrito que también están implicados en muchos otros procesos, como la respuesta al estrés oxidativo (12). Los reguladores FUR suelen funcionar como represores, aunque muchos son también activadores, tienen alrededor de 150 aminoácidos y un peso molecular comprendido entre 15 y 17 kDa. Estos reguladores se caracterizan por estar formados por dos dominios estructurales, uno de unión al DNA en el extremo N-terminal, constituido por un motivo hélice-giro-hélice, y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal, conectados por una bisagra (12). Además, dentro de estos dominios se encuentran motivos altamente conservados, como un motivo rico en histidinas, y otro de tipo CXXC, ambos implicados en la unión de iones metálicos con función reguladora o estructural (12).

En cianobacterias, las proteínas FUR actúan como reguladores transcripcionales globales, ya que sus regulones no solo incluyen genes de asimilación de metales, sino que también incluyen genes ligados a un gran número de procesos celulares, como son la respiración, la respuesta a estrés oxidativo, la glicólisis, la quimiotaxis, o el metabolismo de aminoácidos, entre muchos otros (13). En concreto, *Anabaena sp.* PCC 7120 contiene 3 parálogos de proteínas FUR: FurA, FurB y FurC

2.2.1. FurA

FurA es el parólogo FUR que mayor semejanza guarda con las proteínas Fur de heterótrofos. Compuesta por 151 aminoácidos, cuenta con un motivo rico en histidinas y dos motivos CXXC, implicados en intercambios tiol-disulfuro que modulan su actividad de unión al DNA y su capacidad de interactuar con ligandos (14). FurA requiere de la presencia de Fe^{2+} y condiciones reductoras para unirse al DNA (15) y es considerada un regulador global de la expresión génica de *Anabaena sp.*, ya que no solo actúa sobre el control de la homeostasis del hierro, sino que se encuentra estrechamente relacionada con la regulación del metabolismo del nitrógeno y la diferenciación a heterocistos, la fotosíntesis o la morfología celular (16). FurA es capaz de autorregularse, ya que puede unirse a su propio promotor, así como de regular los otros parálogos FUR, FurB y FurC (17). También presenta regulación a nivel post-traducional, pues su interacción con hemo y con 2-oxoglutarato, modula su unión a los promotores diana (18, 19). Además, muestra actividad disulfuro reductasa, lo que hace que esté relacionada con mecanismos de homeostasis redox en el citosol (20)

2.2.2. FurB

FurB, formada por 132 aminoácidos, también presenta un motivo rico en histidinas y dos motivos CXXC implicados en la unión de hemo y de metal regulador, los cuales permiten ajustar su actividad de unión a DNA en respuesta a señales ambientales (21). FurB se considera el regulador Zur de *Anabaena sp.*, ya que es responsable de modular la homeostasis del zinc mediante la regulación de la transcripción de genes relacionados con la asimilación y almacenamiento de este metal (22). También juega un papel importante en la defensa frente al estrés oxidativo, ya sea regulando de la expresión de enzimas de respuesta al mismo, como la superóxido dismutasa y la peroxirredoxina (23), o interactuando de forma inespecífica con el DNA para protegerlo de la degradación por especies reactivas de oxígeno (24). Recientemente, se ha descrito que también está implicada en el tráfico de metales, el desarrollo de heterocistos y la formación de biofilms (25). Al igual que FurA, requiere de condiciones reductoras y la presencia de metal regulador, que en este caso es el zinc para unirse al DNA activa. También es capaz de autorregularse y regular a los otros parálogos Fur (17)

2.2.3. FurC

FurC es la proteína FUR de *Anabaena* que menor semejanza guarda con otras proteínas FUR. Formada por 149 aminoácidos, carece de motivo CXXC y no es capaz de unirse a su propio promotor, ni al del resto de proteínas Fur (17). Es considerado el regulador PerR (Peroxide Response Regulator) de *Anabaena*, ya que controla genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo como la peroxirredoxina y la catalasa y su unión al DNA está modulada por un mecanismo de oxidación catalizada por metal mediante el cual en presencia de estrés oxidativo sufre un cambio conformacional que hace que se libere del DNA (26). FurC también ha sido propuesto como un regulador global, controlando la fotosíntesis y la división celular (27) y jugando un papel clave en el proceso de diferenciación de heterocistos (28)

2.3. Redes de regulación en *Anabaena* sp. PCC 7120

Para una adecuada fisiología celular, es necesario que los genes que controlan los diferentes procesos celulares se expresen en el momento adecuado, lo que implica que los mecanismos de regulación que modulan su expresión sean capaces de responder a señales ambientales. En *Anabaena* sp. PCC 7120 el control de la expresión de genes es llevado a cabo principalmente por reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes.

Los reguladores transcripcionales se unen a secuencias específicas del DNA para activar o reprimir la expresión génica. Generalmente suelen tener dos dominios, un dominio de unión a DNA y un dominio que percibe una señal, como puede ser la presencia de iones metálicos, ligandos, estrés oxidativo o cambios en el estado redox de la célula. La unión del regulador al DNA está modulada por esas señales permitiendo que controle la expresión génica en respuesta a ellas (29). Por su parte, los sistemas de dos componentes son sistemas de transducción de señal que permiten responder a cambios en el entorno en respuesta a estímulos ambientales. Se componen de dos elementos, una sensor o histidín quinasa y un regulador de respuesta. La sensor quinasa es responsable de detectar señales ambientales y, en respuesta a estas fosforilar al regulador de respuesta, lo que desencadena respuestas celulares, que generalmente son cambios en la expresión de genes (30).

Como se ha descrito, la superfamilia de proteínas FUR es una familia de reguladores transcripcionales responsables de orquestar un regulón sumamente complejo en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, y se encargan de mantener procesos esenciales para las cianobacterias como la homeostasis de metales, la respuesta al estrés oxidativo, la fotosíntesis o la regulación del metabolismo del nitrógeno. Además de modular la expresión de genes de forma directa, se ha puesto de manifiesto que las proteínas FUR son capaces de regular la expresión de numerosos reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes, lo que amplía enormemente su regulón y por tanto los procesos celulares que controlan (Jorge Guío, datos no publicados). En concreto, se ha descrito que FurA modula cuatro reguladores transcripcionales y seis sistemas de dos componentes, FurB modula cuatro genes de sistemas de dos componentes y FurC modula tres reguladores transcripcionales y tres sistemas de dos componentes (Jorge Guío, datos no publicados).

Sin embargo, aunque los componentes de esta red han sido identificados como reguladores transcripcionales o sistemas de dos componentes, se desconoce su mecanismo de acción, así como los genes y procesos celulares que controlan. Por ello, teniendo en cuenta la importancia de las proteínas FUR en la fisiología de la cianobacteria, es de interés estudiar y caracterizar los componentes de esta red.

Con la intención de ampliar el conocimiento existente acerca de esta red de regulación, en este trabajo se seleccionó para su estudio el regulador All7016, pues se había descrito que estaba directamente regulado por FurC y que su expresión se veía alterada en una estirpe de sobreexpresión de esta proteína (28).

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar el regulador All7016 de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos

- Realizar un análisis bioinformático del regulador All7016 para obtener información acerca de sus propiedades fisicoquímicas, familia y dominios, relaciones filogenéticas y estructura.
- Optimizar la sobreexpresión de All7016 en células de *E. coli*
- Establecer un método de purificación basado en el uso de la cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC-Co²⁺)
- Determinar si All7016 muestra actividad de unión a DNA *in vitro* y establecer las condiciones necesarias para la unión al DNA

4. Materiales y métodos

4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

4.1.1. Cepas de *E. coli*

La **tabla 1** recoge las cepas de *Escherichia coli* empleadas en este estudio. *E. coli* BL21 (DE3) es una cepa que contiene el locus DE3, codificante de la T7 RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo regulación del promotor *lacUV5*, permitiendo así su inducción por lactosa y su análogo IPTG. Además carece de las proteasas Lon y OmpT, lo que reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en la célula. Por tanto, se empleó esta cepa para la sobreexpresión de la proteína de interés. Por otra parte, *E. coli* BL21 pG-KJE8 es una variante de la cepa anterior que contiene el plásmido pG-KJE8 el cual codifica las chaperonas *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL* y *groES*, que facilitan el plegamiento de proteínas heterólogas que presentan problemas de solubilidad. El plásmido pG-KJE8 confiere resistencia a cloramfenicol y es inducible por arabinosa y tetraciclina.

Cepa	Genotipo	Origen
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , λ (DE3)	Novagen
BL21 pG-KJE8	<i>E. coli</i> BL21 conteniendo el plásmido pG-KJE8. Cm ^R . Permite expresión inducible por Arabinosa y Tetraciclina de las chaperonas <i>dnaK-dnaJ-grpE</i> y <i>groES-groEL</i>	Takara Bio Group

Tabla 1. Cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio

4.1.2. Condiciones de cultivo

Para el cultivo de las cepas de *E. coli* se empleó medio de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura, disueltos en agua destilada y esterilizados mediante autoclave. Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37 °C y 200 rpm en un agitador orbital. En el caso de cultivos en medio sólido, el medio se suplementó con agar al 1,5 % (p/v) y las placas se incubaron a 37 °C en una estufa de cultivos. Cuando fue necesario, se añadieron kanamicina y cloranfenicol a 50 µg/mL para garantizar el mantenimiento de los plásmidos de interés.

Para los experimentos con medio de autoinducción, se preparó medio LB de autoinducción (AIM) a partir de un preparado comercial de la compañía Formedium®, cuya composición final fue de 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de glucosa, 2 g/L de lactosa, 3,3 g/L de (NH₄)₂SO₄, 6,8 g/L de KH₂PO₄, 7,1 g/L de Na₂HPO₄, 0,15 g/L de MgSO₄ y 0,03 g/L de elementos traza (50 mM FeCl₃, 20 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM MnCl₂·4H₂O, 10 mM ZnSO₄·7H₂O, 2 mM CoCl₂·6H₂O, 2 mM CuCl₂, 2 mM NiCl₂, 2 mM Na₂MoO₄, 2 mM Na₂SeO₃ y 2 mM H₃BO₃). Para ello se disolvieron 34,85 g de preparado comercial en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave.

El medio de autoinducción contiene glucosa y galactosa como fuentes de carbono, de forma que la bacteria consume en primer lugar glucosa y, a medida que se va agotando, comienza a metabolizar la lactosa. De esta manera se induce la expresión de genes bajo control del promotor *lac*, como los codificados en el plásmido pET28, de forma gradual y sin necesidad de añadir IPTG, lo que permite que la sobreexpresión de proteínas recombinantes transcurra de forma más lenta.

4.2. Aislamiento y análisis de DNA

4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para amplificar regiones promotoras de interés del genoma de *Anabaena sp.* PCC 7120. Para ello se prepararon mezclas de reacción compuestas por 72 μL de agua miliQ estéril, 10 μL de tampón 10x (Tris-HCl 75 mM pH 9,0, KCl 50 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM), 3 μL de MgCl_2 50 mM, 2 μL de mezcla de dNTPs 10 mM, 2,5 μL de cebador directo 20 μM , 2,5 μL de cebador reverso 20 μM , 1 μL de Taq DNA polimerasa 1 U/ μL (Biotools) y 100 ng de DNA genómico, en un volumen total de 100 μL .

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermal Cycler 2720 de Applied Biosystems. El programa de PCR y la secuencia de los oligonucleótidos se recogen en las 9.1 y 9.2 del Material Suplementario, respectivamente

4.2.2. Electroforesis de DNA

Se verificó la correcta amplificación de las regiones promotoras, así como la ausencia de productos inespecíficos en la reacción de PCR, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Para ello se disolvieron 0.5 g de agarosa en 50 mL de tampón TBE (Tris-HCl 90 mM pH 8, EDTA 2 mM y H_3BO_3 90 mM) calentando poco a poco en un microondas. Se dejó enfriar la solución y, antes de solidificar, se añadieron 50 μL de BrEt 0,5 g/mL y se vertieron sobre un molde.

Para visualizar las muestras se tomaron 4 μL del producto de la reacción de PCR y se mezclaron con 3 μL de tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 8, glicerol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,25% (p/v)). Las muestras se cargaron en el gel, incluyendo un patrón de peso molecular Lambda HindIII (ThermoFisher), y se llevó a cabo la electroforesis en tampón TBE a un voltaje de 90 V durante 25 minutos mediante una fuente BioRad PowerPac300. Se visualizó el gel con el sistema Gel Doc 2000 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1.

4.2.3. Purificación y cuantificación de productos de PCR

Una vez analizados, los productos de PCR se purificaron mediante el kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), eliminando así los reactivos sobrantes de la reacción, como son los oligonucleótidos o los dNTPs, para evitar interferencias en las etapas posteriores del trabajo. Finalmente se determinó la concentración de los productos de PCR mediante el equipo NanoVue PlusTM (GE Healthcare).

4.3. Sobreexpresión de proteínas recombinantes

Para purificar el regulador All7016 se decidió llevar a cabo su sobreexpresión heteróloga en *E. coli* empleando el plásmido pET28:*all7016*, que contiene el gen *all7016* clonado en el plásmido pET-28. La información acerca de la estructura del plásmido pET28 y su mecanismo de inducción está en las secciones 9.3 y 9.4 de Material Suplementario.

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

Para introducir el plásmido pET28:*all7016* en células de *E. coli* se necesita que estas se encuentren en un estado de competencia para que sean capaces de incorporar el DNA exógeno. En este caso se partió de células de *E. coli* BL21 termocompetentes y se introdujo el plásmido mediante choque térmico. Para llevar a cabo el choque térmico se descongelaron alícuotas de 200 μ L de células termocompetentes en un baño de hielo y una vez descongeladas, se añadieron 100 ng de DNA plasmídico en esterilidad, se mezcló con suavidad y se incubó 30 minutos en hielo. A continuación, se sometieron las células a un choque térmico a 42°C durante 60 segundos, tras lo que se transfirieron inmediatamente a un baño de hielo durante 2 minutos. Se añadieron 800 μ L de medio LB estéril a temperatura ambiente y se incubaron 90 minutos a 37 °C con agitación suave (200 rpm). Transcurrida la incubación, se sembró el cultivo en una placa de LB agar con kanamicina para permitir la selección de colonias con el plásmido pET28:*all7016* y se incubó a 37°C O/N.

4.3.2. Prueba de sobreexpresión a pequeña escala

Tras introducir el plásmido pET28:*all7016* se llevó a cabo la prueba de sobreexpresión a pequeña escala, con el fin de obtener información acerca de las condiciones en que el cultivo produce mayor cantidad de proteína. Para ello, se preparó un preinóculo de células BL21 transformadas con el plásmido pET28:*all7016* en un tubo falcon con 10 mL de medio LB estéril y 50 μ g/mL de kanamicina, que se incubó a 37 °C O/N. Al día siguiente, se prepararon 4 tubos falcon con 10 mL de medio LB suplementado con 50 μ g/mL de kanamicina y se agregaron 100 μ L del preinóculo. Se monitorizó el crecimiento del cultivo midiendo su densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm hasta que la absorbancia alcanzó el valor de 0,6, momento en el que el cultivo se encuentra en la fase exponencial de la curva de crecimiento, permitiendo una mayor productividad en cuanto a la sobreexpresión de proteína. Se dividió cada cultivo en dos tubos de 5 mL, para ensayar las 4 condiciones de inducción, que se indican en la Tabla 2. En cada condición uno de los cultivos se indujo con 1mM de IPTG y el otro se dejó sin inducir.

Condición	2h a 37°C		4h a 37°C		4h a 30°C		O/N a 15°C	
	-	+	-	+	-	+	-	+
IPTG 1 mM	-	+	-	+	-	+	-	+

Tabla 2. Esquema de las condiciones estudiadas en la prueba de sobreexpresión.

Para determinar el nivel de sobreexpresión en las condiciones estudiadas, se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 17%, técnica que se describe en el apartado 4.5.2 de este trabajo. Para ello se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó en un tubo Eppendorf durante 5 min a 16000 x g. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 75 μ L de agua miliQ y se añadieron 15 μ L de Laemmli buffer 6x (60 mM de Tris-HCl pH 6,8, 9,6 % (p/v) de SDS, 42 % (v/v) de glicerol, 0,06 % (p/v) de azul de bromofenol y 30 % (v/v) de β -mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 min, se centrifugaron 1 minuto a 16000 x g. y se cargaron 10 μ L de sobrenadante en geles de SDS-PAGE

4.3.3. Prueba de solubilización

Para encontrar unas condiciones óptimas de solubilización de la proteína se llevaron a cabo dos estudios. Por una parte, se analizó la solubilización llevando a cabo la rotura celular en cuatro tampones diferentes y, por otra parte, se llevó a cabo la sobreexpresión de All7016 empleando diferentes estirpes de *E. coli* y medios de cultivo. En concreto, se llevó a cabo la sobreexpresión en células de *E. coli* pG-KJE8 en medio LB y de *E. coli* BL21 en medio de autoinducción.

En el primer estudio, dado que el pI teórico de la proteína era de 9,03, se utilizó como tampón base KPi 50 mM pH 7,5, que se suplementó con agentes que favorecen la rotura celular y la solubilización proteica como el NaCl, el glicerol o el Tween. En concreto se estudió la solubilidad en tampón base con 500 mM de NaCl y 10 % de glicerol (tampón 1), tampón base con 500 mM de NaCl, 10 % de glicerol y 0,1 % de Tween (tampón 2) y tampón base con 500 mM de NaCl, 10 % de glicerol y 1 U de lisozima (tampón 3). También se analizó la solubilidad en tampón 2 M de cloruro de guanidinio, 10 mM de Tris-HCl y 100 mM de NaH₂PO₄ a pH 8 (tampón 4), pues el cloruro de guanidinio se asocia a las cadenas laterales de los aminoácidos, minimizando las interacciones que dan lugar a los fenómenos de agregación (31). Para analizar la solubilidad se centrifugaron 5 mL de células BL21 sobreexpresando el regulador All7016 y se resuspendió el precipitado en 1 mL del tampón correspondiente suplementado con 1 mM de PMSF, un inhibidor de proteasas.

Para el segundo estudio se generó biomasa de células sobreexpresando el regulador All7016 en diferentes condiciones: células BL21 cultivadas en medio LB e inducidas O/N a 15 °C siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.2, células BL21 cultivadas en medio de autoinducción (AIM) durante 24 horas a 25 °C y 48 horas a 15 °C y células BL21 pG-KJE8 cultivadas en medio LB e inducidas O/N a 15 °C. Para cultivar las células BL21 pG-KJE8 e inducir la expresión del regulador All7016 se siguió el mismo procedimiento que para las células BL21 (apartado 4.3.2), pero en este caso fue necesario suplementar el medio con 1 mg/ mL de L-arabinosa y 10 ng/mL de tetraciclina para inducir la sobreexpresión de las chaperonas, y con 50 µg/mL de cloranfenicol para el mantenimiento del plásmido pG-KJE. En este estudio, se centrifugaron 5 mL de cada cultivo y se resuspendió el precipitado en 1 mL de tampón KPi 50 mM pH 7,5 con 500 mM de NaCl, 10 % de glicerol y 0,1 % de Tween y suplementado con 1 mM de PMSF.

En todos los casos, para llevar a cabo la rotura celular, se sometió la suspensión a dos ciclos de congelado y descongelado en nitrógeno líquido, seguidos de 5 ciclos de sonicación, consistentes en 45 s a una amplitud de 80% y ciclo 0,5, espaciados por 30 s de reposo, manteniendo en todo momento la muestra en hielo para evitar la desnaturalización proteica por calentamiento. Una vez rotas las células y liberado el contenido celular al medio, se centrifugaron durante 10 minutos, a 4°C y 12000 rpm para separar el precipitado (material insoluble) del sobrenadante (material soluble). El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua mili Q y en ambos casos se añadieron 200 µL de Laemmli buffer 6x. Las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 min, se centrifugaron 1 minuto a 16000 x g, y se cargaron 10 µL de sobrenadante en geles de SDS-PAGE (apartado 4.5.2.).

4.4. Purificación de proteínas recombinantes

4.4.1. Obtención de biomasa

Para purificar el regulador All7016 en primer lugar fue necesario obtener biomasa de células de *E. coli* sobreexpresando la proteína. Para ello, se prepararon preinóculos de 10 mL de medio LB con 50 µg/mL de kanamicina (y 50 µg/mL de cloranfenicol en el caso de las células BL21 pG-KJE8) inoculados con colonias de células BL21 o BL21 pG-KJE8 transformadas con el plásmido pET28:*all7016*. Estos cultivos se incubaron a 37°C y 200 rpm O/N para iniciar a la mañana siguiente cultivos en 1 L de LB estéril con 50 µg/mL de kanamicina (y 50 µg/mL de cloranfenicol, 1 mg/mL de arabinosa y 10 ng/mL de tetraciclina en el caso de las células BL21 pG-KJE8). Se incubaron estos cultivos a 37°C y 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. En este punto, se indujo la expresión del regulador All7016 a partir del plásmido pET28:*all7016* añadiendo 1 mL de IPTG 1M, tras lo que se permitió la expresión de la proteína durante 4 horas a una temperatura de 30°C. Pasado este tiempo, se centrifugó todo el volumen de cultivo durante 15 minutos, a 4°C y 10000 x g, se descartó el sobrenadante y el precipitado se conservó a -20 °C hasta su uso.

4.4.2. Rotura celular

Para que las células liberen su contenido es necesario llevar a cabo la rotura celular, que en este caso se realizó por sonicación. Para ello se descongelaron 10 gramos de la biomasa generada en el punto 4.4.1, y se resuspendieron en 50 mL de tampón de purificación. Se llevaron a cabo dos purificaciones, una empleando como tampón base KPi 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol 10 % y Tween 0,1% y otra empleando como tampón base cloruro de guanidinio 2 M, NaH₂PO₄ 100 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8. En ambos casos, se añadió 1 mM de PMSF para inhibir las proteasas. Las células se rompieron mediante 10 ciclos de sonicación de 45 segundos a 80 % de amplitud y ciclo 0,5, espaciados por 30 segundos de reposo, manteniendo la preparación siempre en un baño de hielo, que evita el sobrecalentamiento de la muestra y la consiguiente desnaturalización de la proteína. Una vez rotas las células, la suspensión se sometió a 3 ciclos de centrifugación durante 15 minutos a 12 000 x g para clarificar la muestra. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se conservó a 4 °C hasta su utilización

4.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad de unión a metales

La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Esta cromatografía permite retener proteínas en una matriz en base a su capacidad de unirse a un metal inmovilizado en la misma. En este caso, la secuencia codificante del gen *all7016* se clonó con una cola de histidinas en el extremo amino terminal, lo que permite su unión al metal de la columna, en este caso cobalto.

Se llevaron a cabo dos estrategias de purificación, una utilizando como tampón de purificación KPi 50 mM pH 7,5 y otra en la que se utilizó como tampón cloruro de guanidinio 2 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 8. En ambos casos, en primer lugar se llevó a cabo el empaquetamiento y equilibrado de la columna. La matriz utilizada fue *Chelating Sepharose Fast Flow*, que se aplicó en una columna de cristal y se empaquetó, primero por gravedad y luego con un flujo de 3 mL/min de agua mili Q, hasta tener 10 mL de resina empaquetada. Dado que la resina está preservada en etanol al 20 %, se llevó a cabo un lavado con 10 volúmenes (V) de lavados con agua miliQ y a continuación se inmovilizó el metal en la columna, para lo que se aplicaron 3 V de CoCl₂ 0,25 M. Una vez inmovilizado el metal, se lavó la columna con 5 V de agua mili Q para eliminar el exceso de metal no adherido, y se equilibró con 10 V del tampón de purificación correspondiente.

Una vez equilibrada la columna se cargó el extracto crudo, recogiendo el eluido de la columna para comprobar que la proteína se había fijado al metal. Después se lavó la columna empleando tampón de lavado hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0,1, para eliminar de la columna todas las proteínas que se hubieran unido con baja afinidad. En el caso de la purificación con Kpi 50 mM pH 7,5 se el lavado se llevó a cabo con 20 V de Kpi 50 mM pH 7,5, 500 mM de NaCl, 10 % (v/v) de glicerol con 40 mM de imidazol. En la purificación con cloruro de guanidinio 2 M los lavados se llevaron a cabo con 10 V de (NH₄)₂SO₄ 0,5 M en tampón de purificación seguidos de 5 V de glicina 35 mM en tampón de purificación. En ambos casos se recogió el eluido de la columna para verificar que el regulador All7016 no se perdía durante los lavados.

Finalmente se eluyó la proteína de interés utilizando un gradiente de imidazol de 40 mM a 1M en el tampón de purificación correspondiente. El volumen de elución se recogió en alícuotas de 1 mL, que se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida para determinar que fracciones contenían la proteína de interés. Finalmente, se regeneró la columna para posteriores usos, dejando pasar 5 V de agua mili Q, seguidos de 5 V de Strip Buffer (500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8), 5 V de NaCl 500 mM, 3 V de agua mili Q y 5 de V al 20% (v/v)

Una vez determinadas mediante electroforesis las fracciones que contenían la proteína de interés en mayor cantidad y grado de pureza, se combinaron dichas fracciones y se sometieron a dos ciclos de diálisis en tampón KPi 50 mM, 100 mM de NaCl y 10% de glicerol a pH 7,5 en la primera estrategia de purificación o en tampón acético-acetato 10 mM a pH 4 en la purificación con cloruro de guanidinio.

4.5. Técnicas analíticas de proteínas

4.5.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Para poder analizar en gel de SDS-PAGE las alícuotas obtenidas en la purificación con cloruro de guanidinio, es necesario realizar un paso previo de precipitación con TCA al 10% (v/v) para eliminar el guanidinio, pues este interfiere con la migración de las proteínas. Para ello se mezclaron 15 μ L de la alícuota a analizar con 85 μ L de agua mili Q y 100 μ L de TCA 10%. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron a 16000 x g y 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 500 μ L de acetona fría y se volvió a centrifugar 16000 x g y 4 °C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se dejaron los tubos abiertos durante 10 minutos para evaporar la acetona y finalmente se resuspendieron en 20 μ L de agua mili Q. Las muestras se analizaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de SDS-PAGE como se describe en el apartado 4.5.2.

4.5.2. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida se empleó para analizar el nivel de expresión de la proteína de interés en las pruebas de expresión, su solubilidad en las diferentes pruebas de solubilización y para analizar los diferentes pasos de purificación.

Para llevar a cabo esta técnica se tomaron 15 μ L de muestra, que se mezclaron con 3 μ L de Laemmli Buffer 6x, se hirvieron durante 4 min a 95 °C y se centrifugaron 5 min a 10 000 x g. Finalmente se cargaron 10 μ L de sobrenadante en los geles de SDS-PAGE y se llevó a cabo la electroforesis en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 200 mM y SDS 3,5 mM durante 45 minutos con un amperaje constante de 35 mA por gel, empleando una fuente de corriente PowerPac Basic, Bio-Rad. Se emplearon geles de SDS-PAGE con una región concentradora del 5 % de acrilamida/bisacrilamida y una región separadora del 17 % de acrilamida/bisacrilamida, cuya preparación se recoge en la sección 9.5. del Material Suplementario.

Finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0,25 % (p/v) de Coomassie Blue R-250, 10 % (v/v) de ácido acético, 45 % (v/v) de metanol y 45 % de agua) durante 30 minutos en agitación y, transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de colorante con una disolución decolorante (10 % (v/v) ácido acético, 25 % (v/v) metanol y 65 % de agua).

4.5.6. Cuantificación de las proteínas por espectroscopía

Tras la purificación, se obtuvo un espectro UV-Visible del regulador All7016 empleando un espectrofotómetro Specord 250 Plus (Analytik Jega AG) y utilizando como blanco el tampón empleado en la diálisis. La proteína se cuantificó a partir de su absorbancia a 280 nm, aplicando la ley de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$), que permite relacionar la absorbancia obtenida (Abs) con la concentración protéica (c), en base al coeficiente de extinción molar de la proteína, cuyo valor teórico en este caso era $\epsilon_{280} = 31190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6. Ensayos de Retardo de Movilidad Electroforética (EMSA)

Los ensayos de retardo en gel (*Electrophoretic Mobility Shift*, EMSA) permitieron analizar la unión del regulador All7016 al DNA. Esta técnica se basa en la capacidad de los reguladores transcripcionales para reconocer y unirse de manera específica a sus regiones diana en el DNA, formando *in vitro* un complejo DNA-proteína que da lugar a una migración retardada en una electroforesis nativa. Dado que la mayoría de reguladores transcripcionales están autorregulados, se eligió el promotor del gen *all7016* como fragmento de DNA de estudio. Además, para determinar si la unión de la proteína a la región promotora seleccionada era específica se añadió un fragmento de DNA inespecífico, *ifpkn22*, que corresponde al fragmento interno del gen *pkn22*.

Se prepararon geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 4%, cuya composición se recoge en la sección 9.6 de Material Suplementario, de manera que se genera un entramado con poros con un tamaño suficiente para permitir la migración de los complejos DNA-proteína. Una vez formados, los geles se precorrieron durante al menos 30 minutos, a 60 V y 4°C, en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 y glicina 380 mM, equilibrando el gel en tampón de electroforesis a la temperatura adecuada.

Las mezclas de reacción se prepararon mezclando concentraciones crecientes de proteína purificada (250, 500, 750 y 1000 nM) con 25 ng de la región promotora del gen *all7016* y 25 ng de DNA inespecífico (*ifpkn22*) en tampón de unión (Bis-Tris 10 mM pH 7,5, KCl 40 mM, glicerol 5 % (v/v) y BSA 50 µg/mL). Además, se ensayaron diferentes condiciones como la presencia de reductor (DTT 1 mM) de metal (MnCl₂ 100 µM) o de quelante de metales (EDTA 200 µM). Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se mezclaron con 3 µL de tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 30 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v)). Finalmente, se cargaron en los geles no desnaturalizantes al 4 % y se llevó a cabo la electroforesis a 90 V y 4 °C durante 90 min en el mismo tampón empleado para precorrer los geles. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con 1 µg/mL de SyBr[®] Safe Fluorescent Dye durante 10 min en agitación y se revelaron con ayuda de un transiluminador.

4.7. Técnicas bioinformáticas

Se determinaron las propiedades biofísicas de la proteína empleando ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) y la presencia de dominios específicos se utilizó la herramienta Prosite (<https://prosite.expasy.org/>). También se determinó la estructura secundaria mediante PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), mientras que el modelado *in silico* de la estructura terciaria se realizó con AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) y Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>). Las predicciones de estructura terciaria se visualizaron mediante el programa PyMol (<https://pymol.org/>)

También se llevó a cabo un estudio filogenético del regulador All7016. Para ello, se buscaron proteínas homólogas en otras cianobacterias y en otros procariontes llevando a cabo un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), en el servidor BLASTP del NCBI (<https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>). En ambos casos se construyó un árbol filogenético en el portal Phylogeny.fr. (<http://www.phylogeny.fr>). Para ello se llevó a cabo un alineamiento múltiple utilizando la herramienta ClustalW (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=clustalw) , seguida de una curación del alineamiento con GBlocks (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=gblocks), para eliminar regiones divergentes o posiciones mal alineadas. Finalmente, se construyó el árbol mediante PhyML (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=phyml) y se visualizó mediante TreeDyn (http://www.phylogeny.fr/one_task.cgi?task_type=treedyn). Los alineamientos múltiples se visualizaron con Jalview (<https://www.jalview.org/>)

5. Resultados

5.1. Análisis bioinformático del regulador All7016

Partiendo de la secuencia de aminoácidos de All7016 y empleando la herramienta ProtParam de ExPasy se pudieron obtener datos biofísicos de esta proteína. Este análisis puso de manifiesto que se trataba de una proteína de 255 aminoácidos, con un peso molecular de 28,8 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 9,03. El coeficiente de extinción molar a 280 nm era de $31190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, asumiendo que todas sus cisteínas están oxidadas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos mediante la herramienta Prosite (EXPASY) (Figura 1), identificaba esta proteína como un regulador transcripcional de la familia LuxR que se caracteriza por la presencia de dos dominios, un dominio de unión al DNA de tipo LuxR en el extremo carboxilo terminal y un dominio sensor en el extremo amino terminal (32). Esta familia de reguladores controla una gran cantidad de procesos celulares y suelen funcionar como activadores en respuesta a señales reconocidas por el dominio sensor del extremo amino-terminal

```
MTIPLKLI FETINQAPSE HELRLQVVPQIGEYFGAKRYSIFFFEQLSLAADKNLQKILKIALSIEHNPIA
HYLVERHAPVHEALVMSPKAWKVICPRQDHWVMAGPIINRNQIVGVVGCTREKSMPAFDTONLTDLSSI
CLHLSVWAATVDSQSTATAKSHHYPFQSDACGGLRQHLLTPRELQIAQLVALGLTNAEIGHQLWITENSVK
QALKRMFRKLVSSRAEMVAQLLARKHYSPEANLDTFYLVPSNQ
```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos del ORF del regulador All7016 y análisis de la presencia de dominios en el mismo mediante Prosite. El dominio GAF aparece marcado en color rosa y con el motivo CP resaltado y el dominio de unión al DNA, tipo LuxR, en color amarillo, con el motivo HTH de unión al DNA resaltado.

En el caso de la proteína All7016, se obtuvo que el dominio sensor era un dominio GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclase and FhlA) comprendido entre los aminoácidos 19 y 146. Los dominios GAF participan como sensores en el reconocimiento de diferentes tipos de señales y son abundantes en sensores quinasa de *Anabaena*, donde suelen actuar como sensores de cGMP (33). Sin embargo, en este caso se observó que el dominio GAF contenía un motivo CP, para el que se ha descrito su implicación en la unión de hemo (34). Por su parte, el dominio de unión al DNA estaba comprendido entre los aminoácidos 192 y 219 y contenía un motivo HTH comprendido entre los aminoácidos 171 y 236.

Una vez realizado el análisis de dominios se llevó a cabo una predicción de la estructura secundaria mediante PsiPred, que se muestra en la Figura 2.

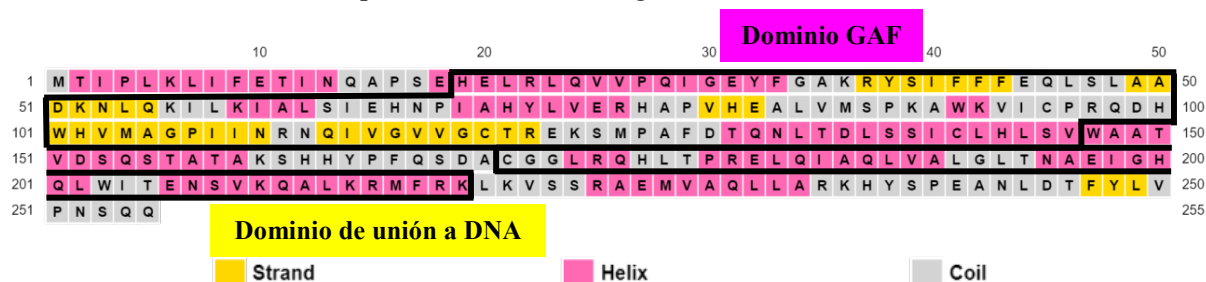


Figura 2. Predicción de la estructura secundaria del regulador All7016 mediante PsiPred. Se muestran en rosa las regiones predichas como hélices alfa, en amarillo las predichas como láminas beta y en gris las predichas como bucles. Recuadrados en negro los dominios GAF y de unión a DNA.

Como se observa en la Figura 2, se predice que el dominio GAF se compone de 5 hélices alfa y 5 láminas beta, separadas entre sí por bucles que conforman un bolsillo donde alojar al ligando (33), mientras que el dominio LuxR se compone únicamente de hélices alfa separadas por bucles. Además, se predice que este dominio incluye un motivo HTH, que como su nombre indica, se compone de dos hélices alfa separadas por un bucle.

La estructura terciaria del regulador All7016 se predijo mediante el servidor AlphaFold a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 3). Esta herramienta combina la búsqueda de modelos de secuencias homólogas y el alineamiento múltiple para generar una predicción de estructura terciaria con un grado de precisión muy alto, en proteínas cuya estructura real se desconoce (35).

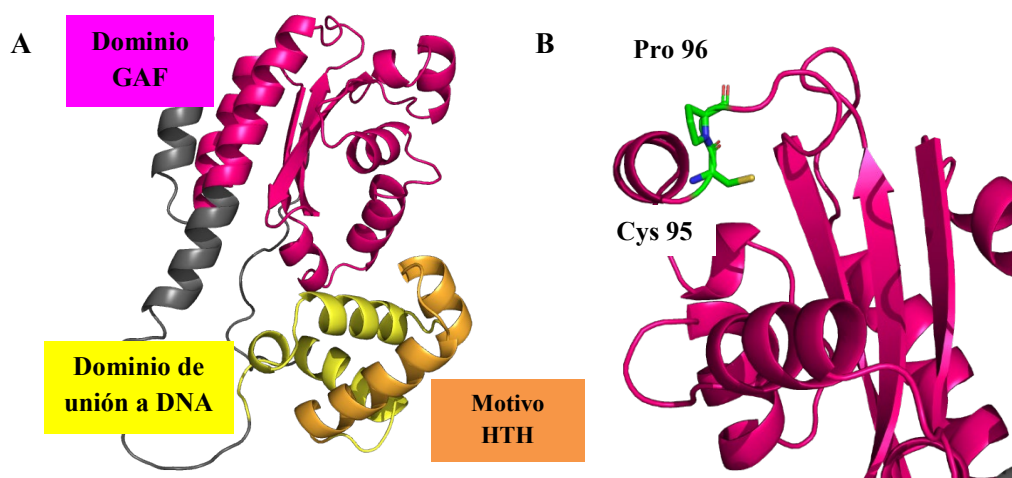


Figura 3. Predicción de la estructura terciaria del regulador All7016 empleando el servidor AlphaFold *A.* Estructura terciaria del regulador All7016, en la que se resalta en rosa el dominio GAF y en amarillo el dominio LuxR, con el motivo HTH resaltado en naranja. *B.* Detalle del dominio GAF, en el que hay un motivo CP, descrito en la literatura como un motivo de interacción con hemo (34)

Como se observa en la figura 3 los elementos de estructura secundaria de los dos dominios coinciden con la predicción de PsiPred (Figura 2). Además, en el dominio GAF destaca la presencia de un motivo CP, orientado hacia la superficie de la proteína, que habitualmente une hemo en proteínas que funcionan como sensor de este metabolito (Figura 3B) (34)

A continuación, se llevó a cabo un modelado por homología utilizando el servidor Phyre2. Así se obtuvo un modelo en base a la estructura del represor de control de Quorum Sensing QscR (PDB: 3SZT). Al superponer este modelo con el predicho por AlphaFold se observa que la orientación de los elementos de estructura secundaria de los dominios GAF y de unión a DNA cambia, pero que mantiene la misma secuencia de elementos de estructura secundaria (Figura 4A). Además, dado que el regulador QscR dimeriza y el regulador All7016 mostraba homología con esta proteína, fue posible predecir una estructura para un posible dímero del regulador all7016 (Figura 4B)

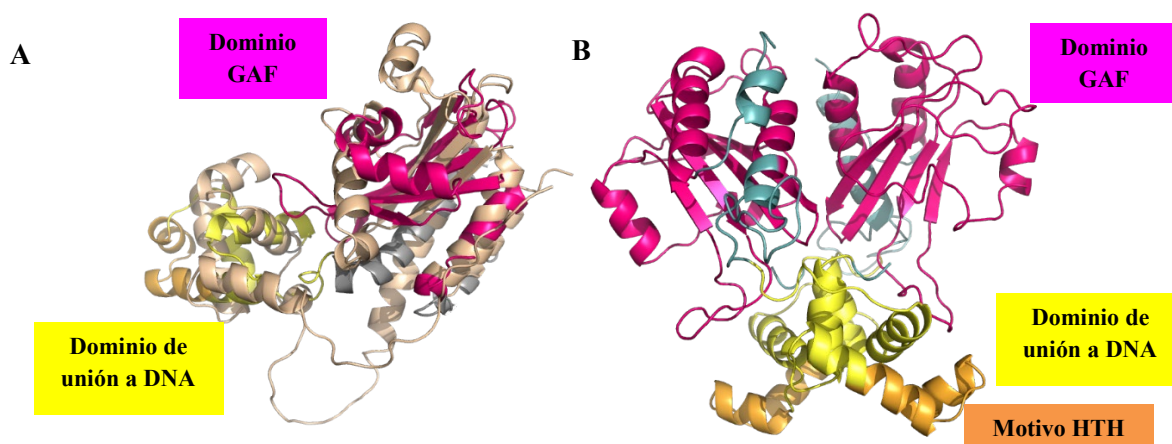


Figura 4. Predicción de la estructura terciaria del regulador All7016 empleando el servidor Phyre 2 *A.* Superposición del modelo construido por Phyre2 (gris), en el que se resalta en rosa el dominio GAF y en amarillo el dominio de unión a DNA, sobre el modelo de Alpha Fold (crema) *B.* Predicción de los dímeros del regulador All7016, con el motivo HTH coloreado de naranja.

A continuación, se estudió la presencia de este regulador en otras cianobacterias, para lo cual se buscaron homólogos en cianobacterias utilizando el servidor BLASTP, y se construyó un alineamiento múltiple y un árbol filogenético (secciones 9.7, 9.8 y 9.9 de Material Suplementario). Se observó que tanto el dominio GAF como el dominio tipo LuxR estaban altamente conservados en todas las cianobacterias, destacando la presencia del motivo CP de unión a hemo en todas las secuencias analizadas (figura 5). Con respecto al árbol filogenético, se observó que las secuencias filogenéticamente más próximas a las de *Anabaena* eran las de *Calothrix* y *Tolypothrix* (figura S-3).

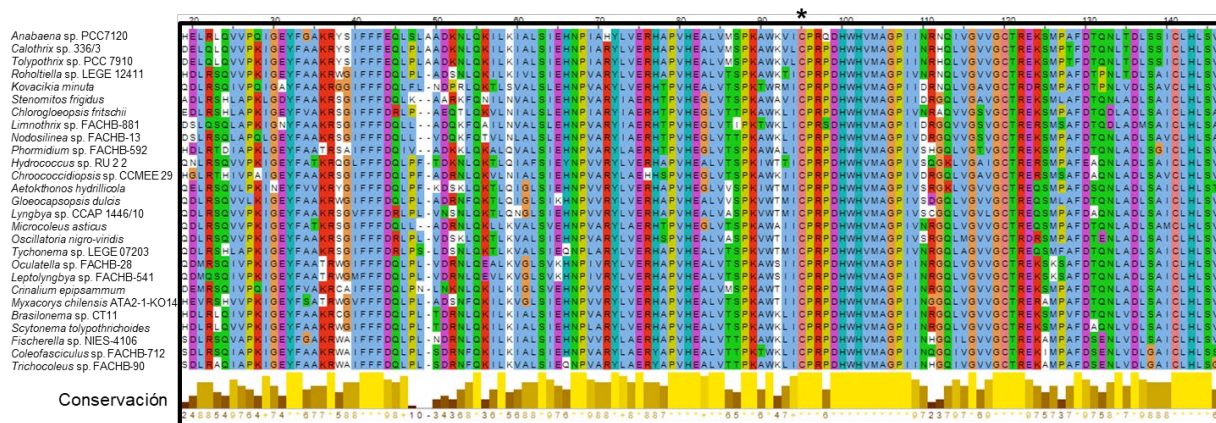


Figura 5. Alineamiento múltiple del dominio GAF del regulador All7016 en *Anabaena* sp. PCC 7120 con homólogos en otras cianobacterias. Se indica con un asterisco la cisteína del motivo CP. El alineamiento completo se muestra en la sección 9.9. del Material Suplementario.

Finalmente, se comparó la secuencia de aminoácidos del regulador All7016 de *Anabaena* con la de otros reguladores transcripcionales de la familia LuxR en otros procariontes, llevando a cabo un alineamiento múltiple y construyendo un árbol filogenético (Secciones 9.10, 9.11 y 9.12 del Material Suplementario). Se observó que, a diferencia de lo que sucedía en cianobacterias, en homólogos de otros procariontes que contienen el dominio LuxR, el dominio GAF no está presente, pues la región que alineaba con este dominio era muy divergente en todas las secuencias (Figura 6). Además, ninguna de estas proteínas presentaba un motivo CP de unión a hemo en esta región. Con respecto al árbol filogenético, se obtuvo que las secuencias filogenéticamente más cercanas eran las de los reguladores CsgD de *Escherichia coli*, implicado en la formación de biofilms (36); y ComA de *Bacillus subtilis*, implicado en respuestas a estreses ambientales (37) (figura S-5).

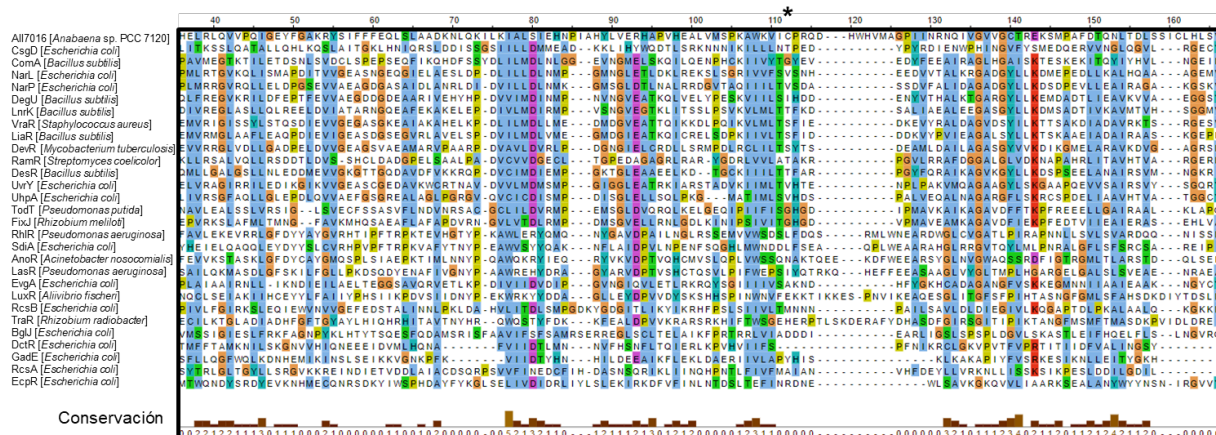


Figura 6. Alineamiento múltiple del dominio GAF del regulador All7016 en *Anabaena* sp. PCC 7120 con la región correspondiente de reguladores de la familia LuxR de otros procariontes. Se indica con un asterisco la cisteína del motivo CP. El alineamiento completo se muestra en la sección 9.12. de Material Suplementario.

5.2. Prueba de sobreexpresión

Tras analizar las propiedades del regulador All7016 mediante estudios bioinformáticos y disponer de indicios de que el gen *all7016* codificaba para un regulador transcripcional de tipo LuxR, se abordó la purificación de la proteína para poder estudiarla. Para ello se transformaron células BL21 con el plásmido pET28:*all7016* y se llevó a cabo un ensayo de sobreexpresión con diferentes tiempos y temperaturas de inducción para conocer las condiciones de máxima expresión de la proteína recombinante. Los resultados de este ensayo se recogen en la **Figura 7**.

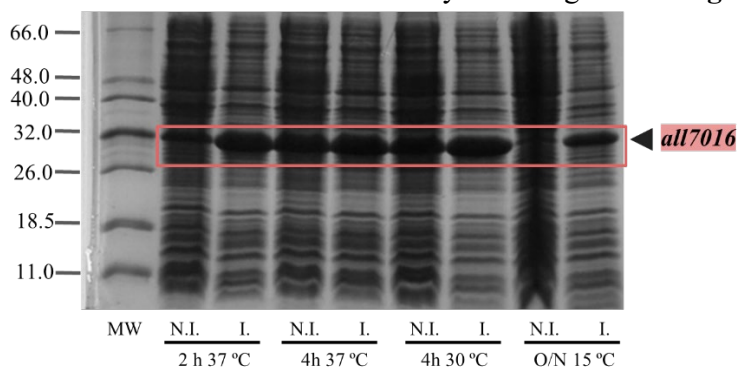


Figura 7. Prueba de sobreexpresión del regulador *all7016* con diferentes tiempos y temperaturas de inducción. Se analizó en geles SDS-PAGE al 17% el nivel de sobreexpresión del regulador All7016 de extractos de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el vector pET28:*all7016* e inducidos en diferentes condiciones, indicadas en la parte inferior: 2h a 37°C; 4h a 37°C; 4h a 30°C y O/N a 15°C. Para cada condición, se comparan células sin inducir (N.I.) con células inducidas con 1 mM de IPTG (I.). Se indica la banda que corresponde al regulador All7016. El primer carril (MW) corresponde al marcador Low Molecular Weight Protein Marker II de NZY.

Como se observa en la Figura 7, la sobreexpresión de la proteína de interés en todas las condiciones ensayadas fue satisfactoria. No obstante, en la condición de 4h a 30 °C la banda del regulador es aparentemente más gruesa e intensa que en el resto de condiciones ensayadas, por lo que se eligieron estas condiciones para llevar a cabo la sobreexpresión del regulador All7016.

5.3. Análisis de la solubilización empleando diferentes tampones

Dado que se había observado que se obtenía una buena sobreexpresión del regulador se llevó a cabo una purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos con cobalto (IMAC-Co²⁺), utilizando como tampón de purificación KPi 50 mM a pH 7,5. Al analizar por electroforesis desnaturante SDS-PAGE los extractos protéicos obtenidos en las diferentes etapas de purificación, no se observó la banda de All7016, pero sí que se reconocía en los pocillos correspondientes a la muestra del precipitado obtenido tras clarificar la biomasa sonicada, indicando que la proteína no se encontraba en su forma soluble, y se perdía antes de poder fijarla en la columna (Figura S-7, Sección 9.13 del Material Suplementario).

Por ello, se analizó la solubilidad del regulador All7016 empleando diferentes tampones de rotura celular. En concreto, tampón Kpi 50 mM pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % glicerol (tampón 1); tampón Kpi 50 mM pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % glicerol y 0,1 % de Tween (tampón 2) y tampón Kpi 50 mM pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % glicerol y 1 U lisozima (tampón 3), pues tanto el NaCl como el glicerol ayudan a la solubilización de las proteínas y el Tween y la lisozima ayudan a romper las membranas y compartimentos celulares (38). Además se analizó también la solubilidad en tampón 2 M de cloruro de guanidinio, 100 mM NaH₂PO₄ y 10 mM de Tris-HCl pH 8 (Tampón 4), pues en trabajos anteriores se había descrito que permitía la purificación de reguladores transcripcionales con problemas de solubilidad (31). Los resultados de esta prueba se recogen en la Figura 8.

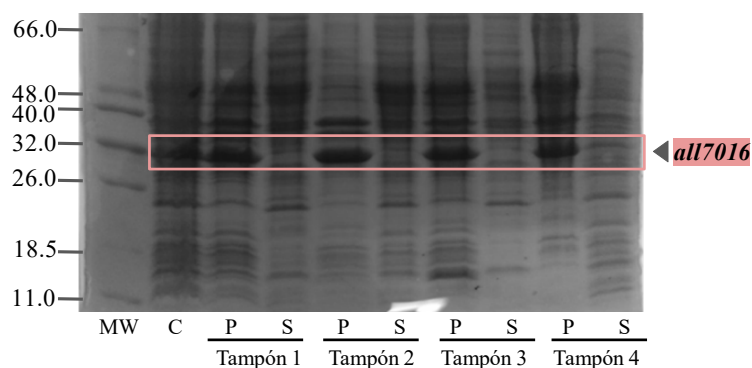


Figura 8. Prueba de solubilización del regulador All7016 con diferentes tampones. Se analizó en geles SDS-PAGE al 17% la solubilidad del regulador All7016 en extractos de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el vector pET28:all7016 e inducidos 4h a 30 °C. Se partió de precipitados de 5 mL de cultivo, de los cuales uno se trató con Laemli Buffer y sirvió como control (C) y el resto se sonicaron en diferentes tampones. Se analizaron el precipitado (P) y el sobrenadante (S) obtenidos tras clarificar el extracto crudo para analizar la fracción insoluble y soluble, respectivamente. En rojo se indica la banda que corresponde a All7016. En el primer carril (MW), el marcador de peso molecular Low Molecular Weight Protein Marker II de NZYTech.

La **figura 8** muestra que en todos los casos la mayor parte de la proteína está en el precipitado y que el regulador All7016 apenas se libera al sobrenadante. No obstante, se puede observar que en el carril correspondiente al tampón 4, consistente en cloruro de guanidinio, aparece una banda a 32 kDa, que se corresponde con el peso molecular de este regulador, lo que indica que la adición de este compuesto brinda cierto grado de solubilidad al regulador.

5.4. Purificación con cloruro de guanidinio

Teniendo en cuenta el ligero efecto del cloruro de guanidinio en la solubilidad de All7016, se llevó a cabo una purificación del regulador mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos con cobalto (IMAC-Co²⁺) empleando cloruro de guanidinio. El resultado se muestra en la figura 9.

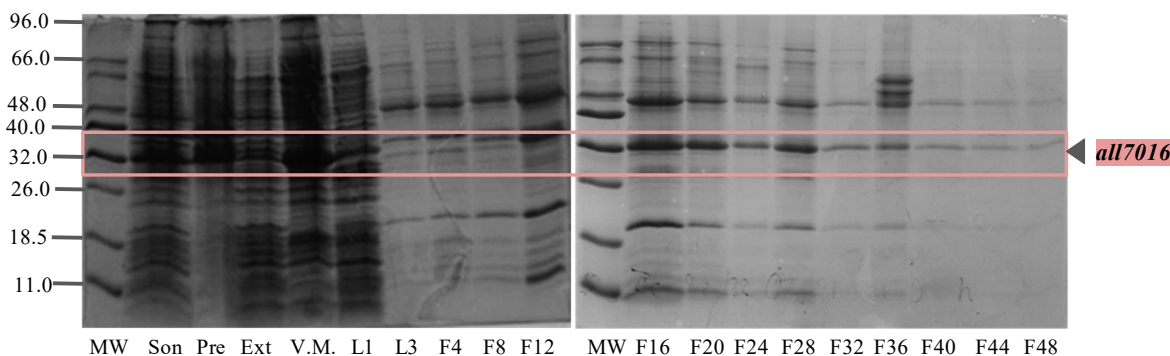


Figura 9. Purificación del regulador All7016 con cloruro de guanidinio. Se analizaron en geles SDS-PAGE al 17% las diferentes etapas del proceso de purificación: biomasa sonicada (Son), el precipitado (Pre) y sobrenadante (Ext) después de la clarificación, volumen muerto (Vm), lavado 1 (L1), lavado 4 (L4) y fracciones eluidas del gradiente de imidazol (F4-F48). En rojo se indica la banda que corresponde al regulador All7016. El primer carril (MW) corresponde al marcador Low Molecular Weight Protein Marker II de NZY.

Como se observa en la figura 9, mediante este protocolo de purificación se obtiene una cantidad aceptable de proteína soluble y con una pureza relativamente alta, aunque una parte importante de ella se pierde en el precipitado de restos celulares y en el volumen recogido durante el fijado del extracto crudo. Esto indica que la proteína precipita o es insoluble, y que no toda la proteína puede fijarse a la columna en estas condiciones. De las fracciones eluidas, se combinaron las comprendidas entre la 12 y la 28 y se dializaron. Sin embargo, durante este proceso, la proteína precipitó y no se pudo recuperar una cantidad detectable de All7016 mediante espectrofotometría.

5.5. Análisis de la solubilización empleando diferentes estirpes y condiciones de cultivo

Dado que el regulador All7016 parecía presentar problemas de solubilidad que ocasionaban su precipitación, aun probando diferentes condiciones de rotura celular, se optó por abordar el problema analizando diferentes métodos de sobreexpresión. Por una parte se analizó su sobreexpresión en células de *E. coli* BL21 cultivadas en medio de autoinducción que, como se ha descrito en la sección 4.1.2. de Materiales y Métodos, permite que la sobreexpresión de las proteínas tenga lugar de forma más lenta, mejorando la solubilidad de proteínas que presenten, problemas de agregación o de plegamiento. Asimismo, se analizó la sobreexpresión de la proteína en la cepa BL21 PG-KJE8, que contiene un plásmido que le dota de la expresión de chaperonas, capaces de contribuir a que el plegamiento de proteínas tenga lugar de forma adecuada, aumentando su solubilidad. Como tampón para llevar a cabo la lisis celular, se empleó KPi 50 mM pH 7,5 con glicerol 10 %, 500 mM de NaCl y 0,1 % de Tween, para ayudar a la rotura celular y a la solubilización. Los resultados de esta prueba de solubilización se recogen en la Figura 10.

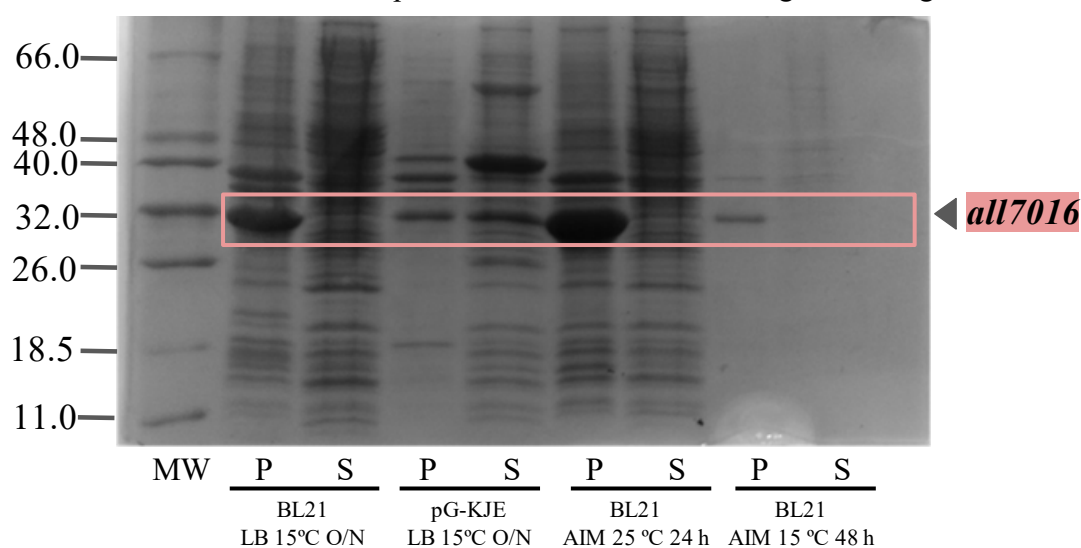


Figura 10. Prueba de solubilización del regulador All7016 empleando diferentes cepas de *E. coli* y medios de cultivo. Se analizó en geles SDS-PAGE al 17% la solubilidad del regulador All7016 en extractos de cultivos de *E. coli* BL21 cultivadas en medio LB e inducidos O/N a 15° C con 1 mM de IPTG; *E. coli* BL21 pG-KJE8 cultivadas en medio LB e inducidos O/N a 15° C con 1 mM de IPTG; *E. coli* BL21 cultivadas en medio de autoinducción durante 24 h a 25 °C y *E. coli* BL21 cultivadas en medio de autoinducción durante 48 h a 15 °C. Se analizaron el precipitado (P) y el sobrenadante (S) obtenidos tras clarificar el extracto crudo para analizar la fracción insoluble y soluble, respectivamente. En rojo se indica la banda que corresponde al regulador All7016. El primer carril (MW) corresponde al marcador Low Molecular Weight Protein Marker II de NZYTech.

Como se observa en la figura 10, el regulador All7016 no fue capaz de solubilizarse al cultivar las células en medio LB ni al cultivar las células en medio de autoinducción. Sin embargo, la sobreexpresión en células BL21 pG-KJE8 si que permitió alcanzar un notable aumento del grado de solubilización del regulador All7016.

5.6. Purificación a partir de biomasa generada en la estirpe pG-KJE8

En base a los resultados obtenidos en la prueba de solubilización en la estirpe de *E. coli* BL21 pG-KJE8, se realizó una generación de biomasa mediante cultivos de esta estirpe, transformada con el vector pET28:all7016. Así, tras obtener la biomasa se realizó una purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados con Co^{2+} (IMAC-Co) empleando como tampón de purificación Kpi 50 mM pH 8, 500 mM de NaCl y 10 % glicerol. Los resultados de esta purificación se recogen en la Figura 11.

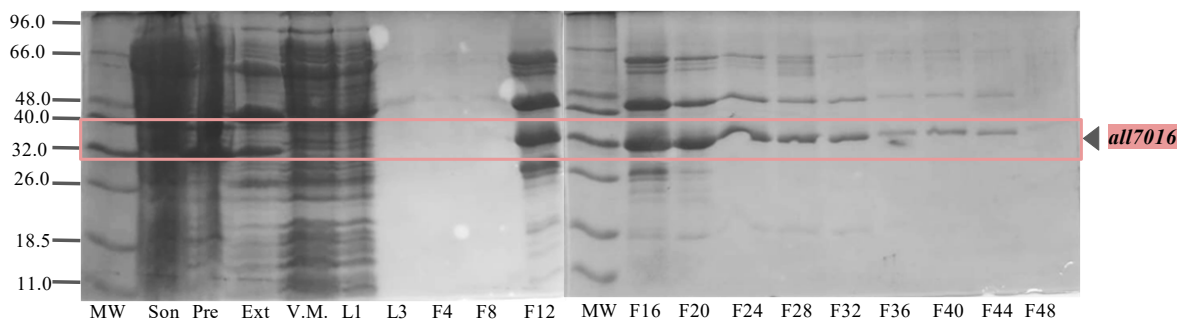


Figura 11. Purificación del regulador All7016 a partir de biomasa de células pG-KJE8. Se analizaron en geles SDS-PAGE al 17% las diferentes etapas del proceso de purificación: biomasa sonicada (Son), el precipitado (Pre) y sobrenadante (Ext) después de la clarificación, volumen muerto (Vm), lavado 1 (L1), lavado 4 (L4) y fracciones eluidas del gradiente de imidazol (F4-F48). En rojo se indica la banda que corresponde al regulador All7016. El primer carril (MW) corresponde al marcador de peso molecular Low Molecular Weight Protein Marker II de NZYTech.

Como muestra la figura 11, la purificación del regulador All7016 a partir de biomasa de células BL21pG-KJE8 permitió obtener una cantidad aceptable de proteína. Aunque las fracciones comprendidas entre la 10 y la 24 presentaban una mayor cantidad del regulador All 7016, presentaba un alto grado de impurezas. Por ello, se seleccionaron las fracciones comprendidas entre la 36 y la 44 que, aunque contenían menor cantidad de la proteína de interés, aparentemente estaban más puras. Así, estas fracciones se combinaron y se dializaron en tampón KPi 50 mM pH 7,5, 100 mM de NaCl y 10 % glicerol

Tras la diálisis la proteína se analizó por espectrofotometría, realizando el espectro UV-Visible entre 250 nm y 700 nm, que se muestra en la **Figura 12**

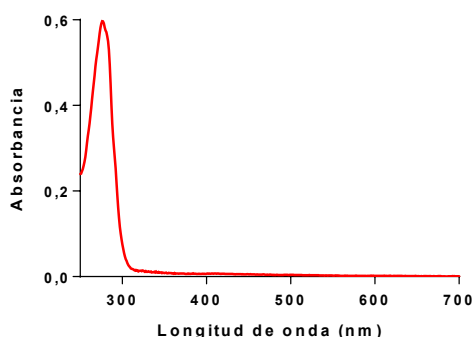


Figura 12. Espectro UV-Visible, a una longitud de onda comprendida entre 250 y 700 nm de la proteína obtenida en la purificación mediante la cepa pG-KJE8.

Como se puede apreciar en la figura 12, la ausencia de picos de absorbancia en la zona del visible indica que, aunque este regulador puede potencialmente unir hemo, se obtiene en la forma libre del ligando.

Finalmente se cuantificó la proteína obtenida, a partir de la absorbancia medida a 280 nm, utilizando la ley de Beer-Lambert y el coeficiente de extinción teórico ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 31190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Puesto a que se habían obtenido de 8 mL de solución proteica a una concentración 10 μM , la cantidad de proteína purificada fue de 2,3 mg. Considerando que se partía de 10 g de biomasa, el rendimiento de la purificación fue bajo, aunque la cantidad de proteína era suficiente para estudiar su actividad de unión al DNA mediante ensayos de retardo en gel.

5.5. Estudio de unión al DNA mediante ensayos de retardo en gel

Puesto que la proteína All7016 se identifica como un regulador transcripcional, finalmente se estudió si la proteína obtenida mantenía la capacidad de unirse al DNA mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA). Los ensayos se realizaron utilizando su propia secuencia promotora como DNA diana, ya que la mayoría de los reguladores transcripcionales de la familia LuxR están autorregulados (39).

Además se establecieron las condiciones de unión del regulador al DNA, por lo que los ensayos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de un agente reductor (DTT), para determinar si su unión al DNA estaba modulada por un proceso redox, y en presencia de Mn^{2+} y EDTA, para determinar si era dependiente de metal, condiciones habituales en este tipo de ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 13.

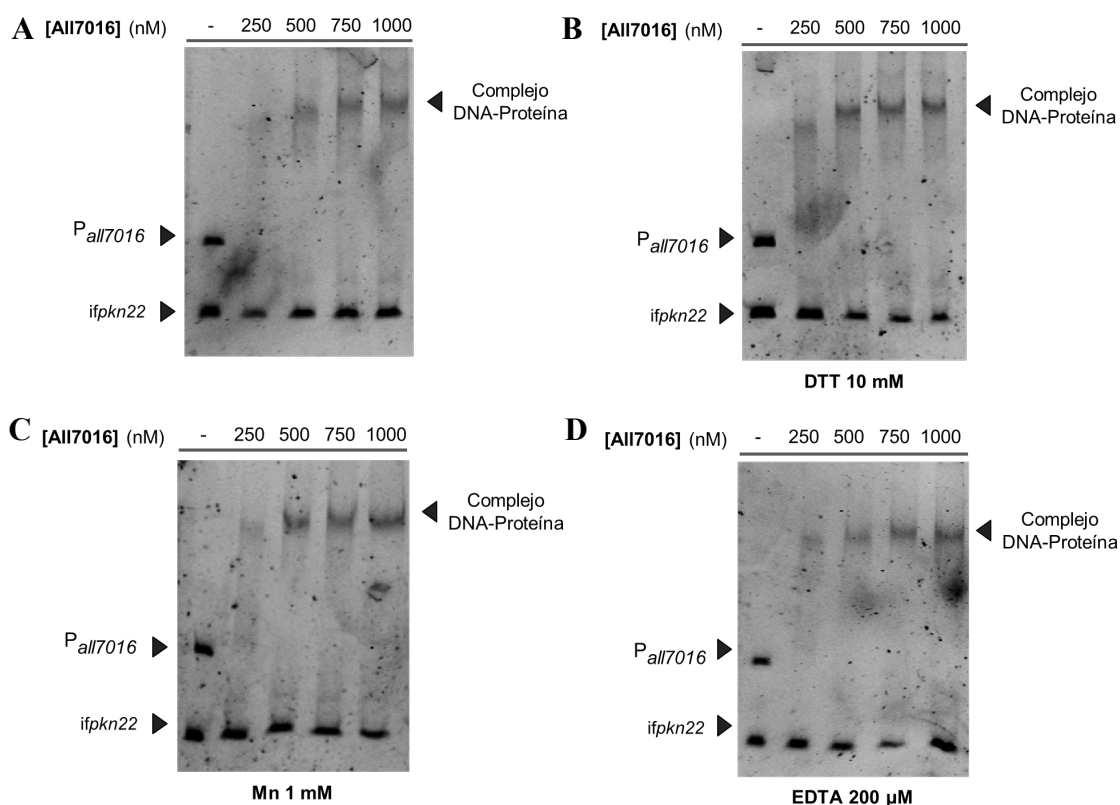


Figura 13. Ensayos de retardo en gel del regulador All7016 con su propia región promotora en geles de poliacrilamida al 4%. El carril 1 corresponde al promotor del gen all7016 en ausencia de proteína y los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden a la región promotora incubada con 250, 500, 750 y 1000 nM de proteína. Los ensayos se realizaron en presencia del promotor de All7016 ($P_{all7016}$), un fragmento de DNA inespecífico (ifpkn22) que sirvió como control y en ausencia de agentes reductores y metal (A), con 1 mM de DTT (B), 1 mM de Mn^{2+} (C) o 200 μM de EDTA (D).

Como se observa en la figura 13A, el regulador All7016 fue capaz de unirse a su propio promotor sin necesidad de añadir agente reductor ni metal. Se puede observar que la banda correspondiente a su propio promotor desaparece y se forma un complejo del regulador All7016, que muestra una migración retardada en el gel. Además, la adición de DTT a la mezcla de reacción no afecta significativamente a la formación de complejos (figura 13B), y lo mismo sucede con la adición de un metal divalente, en este caso Mn^{2+} (figura 13C) o de un agente quelante de metales, el EDTA (figura 13D).

6. Discusión

Las proteínas Fur en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 modulan la expresión de genes pertenecientes a múltiples categorías funcionales. No obstante, su regulón se amplía más allá de la regulación de genes de forma directa, ya que son capaces de modular la expresión de otros reguladores transcripcionales, orquestando una red de regulación transcripcional. Estudios previos pusieron de manifiesto que el gen *all7016*, que codifica para un regulador transcripcional, está directamente regulado por el regulador FurC de *Anabaena* sp. PCC 7120. Este regulador no había sido estudiado, por lo cual se planteó su purificación y caracterización como objetivo del trabajo

6.1. Análisis bioinformático del regulador All7016

En primer lugar se llevó a cabo un análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *all7016*. La información obtenida puso de manifiesto la presencia de motivos estructurales propios de un regulador transcripcional de la familia LuxR, pues contenía un dominio de unión a DNA de tipo LuxR en su extremo carboxilo terminal, con un motivo HTH hélice-giro hélice (39). La predicción de su estructura secundaria y terciaria mostró que los residuos presentaban la estructura característica de los dominios LuxR, formada por cuatro hélices alfa dispuestas en un ovillo, y en la que la segunda y tercera hélice constituyen el motivo de unión a DNA de tipo HTH (figuras 2 y 3) (39).

Los reguladores de la familia LuxR suelen funcionar como activadores, aunque también se ha descrito que algunos funcionan como represores o tienen una función dual, y tienden a estar implicados en el control de diversos procesos celulares en respuesta a señales ambientales, las cuales detectan a través de dominios sensores en su extremo amino terminal (39). En el caso del regulador All7016, el análisis bioinformático reveló que contenía un dominio sensor de tipo GAF en su extremo amino terminal, que, como se observa en las predicciones de estructura secundaria y terciaria (figuras 2 y 3), también presentaba la estructura canónica de este dominio, constituida de una hoja beta antiparalela y 5 hélices alfa.

Los dominios GAF inicialmente se describieron como dominios implicados en la unión de cGMP (40) aunque posteriormente se describió que podían unir también otro tipo de ligandos como 2-oxoglutarato o compuestos aromáticos (41). En este caso, se observó que el dominio GAF presentaba un motivo CP, que se ha descrito que puede mediar la unión no covalente de hemo a varias proteínas y en los que la cisteína es fundamental para la unión y la prolina ayuda a la afinidad de la unión (34). Además, existen evidencias previas de reguladores transcripcionales que pueden unir hemo de forma no covalente a través de un motivo CP y que esta interacción modula su unión al DNA (18, 42). Así, los análisis bioinformáticos permitieron concluir que All7016 es un regulador transcripcional de la familia LuxR con un dominio GAF potencialmente implicado en la unión de hemo. No obstante, son necesarios futuros estudios que permitan demostrar si esta proteína es capaz de unir hemo, por ejemplo analizando la unión de hemo a All7016 mediante espectroscopía diferencial.

Al estudiar la presencia de homólogos de este regulador en otras cianobacterias (figuras S-3 y S-4), se encontró que este regulador estaba presente en un gran número de cianobacterias, tanto en especies fijadoras de nitrógeno como *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema*, como en especies no fijadoras como *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Phormidium*. Se observó que en todas estas especies el dominio GAF estaba altamente conservado (figura 5) y que en todas ellas contenía el motivo CP en la misma posición que la secuencia de *Anabaena*, lo que sugiere que en todas ellas existe un regulador de la familia LuxR con un dominio GAF potencialmente implicado en la unión de hemo.

Por el contrario, al comparar el regulador All7016 con otros reguladores de la familia LuxR en otros procariotas (alineamiento múltiple, figura 6) se observó que, mientras que el dominio de unión a DNA de tipo LuxR estaba conservado, la región correspondiente al dominio GAF no estaba conservada y que ninguna de las secuencias presentaba un motivo CP, lo que sugiere que la existencia de un regulador de la familia LuxR con un dominio GAF potencialmente implicado en la unión de hemo es exclusiva de cianobacterias. Al llevar a cabo un análisis filogenético se observó que las secuencias más próximas eran las de los reguladores CsgD de *Escherichia coli* y ComA de *Bacillus subtilis*, que controlan la formación de biofilms y el *quorum sensing*, respectivamente, y cuya actividad está modulada por condiciones ambientales y un mecanismo de fosforilación (36, 37). Esto indica que los reguladores de la familia LuxR, pese a compartir el mecanismo de unión a DNA, no comparten ni los procesos celulares que controlan ni los estímulos a los que responden.

6.2. Sobreexpresión y purificación del regulador All7016

Con la intención de estudiar este regulador se purificó la proteína All7016 mediante sobreexpresión heteróloga en *E. coli* y purificación mediante IMAC, ya que el gen *all7016* había sido clonado en el plásmido pET28 con una cola de histidinas en el extremo amino terminal. La sobreexpresión de *all7016* en *E. coli* BL21 (DE3) fue satisfactoria (figura 7) por lo que se decidió obtener biomasa y llevar a cabo una purificación mediante IMAC-Co²⁺ empleando como tampón de purificación KPi 50 mM pH 7,5. Sin embargo, al analizar las fracciones obtenidas en esta purificación, se observó que la proteína de interés no aparecía en el gradiente de elución con imidazol y que se encontraba en el precipitado obtenido tras clarificar la biomasa sonicada (figura S-7), lo que sugería que el regulador era insoluble en estas condiciones, posiblemente por la formación de cuerpos de inclusión.

Por ello, se ensayaron diferentes tampones en los que llevar a cabo la lisis de la biomasa y se observó que el uso de un tampón de purificación con cloruro de guanidinio provocaba cierto grado de solubilización (figura 8). Esto se debe a que el cloruro de guanidinio es un agente caotrópico que, aunque a altas concentraciones provoca la desnaturalización proteica, a la concentración utilizada en el estudio (2 M) se ha descrito que ayuda a la solubilidad, disminuyendo el efecto hidrofóbico por el que las proteínas pueden generar agregados (31). Además, se ha descrito un protocolo de purificación con cloruro de guanidinio que resulta exitoso para purificar reguladores transcripcionales con tendencia a la agregación sin perder su actividad de unión a DNA (31). No obstante, al realizar la purificación siguiendo este protocolo se obtuvo que la práctica totalidad del regulador precipitaba en la diálisis (figura 9), lo que imposibilitaba su uso para su purificación.

En consecuencia, se decidió ensayar diferentes cepas y condiciones de cultivo para la generación de la biomasa, con la intención de poder obtener el regulador de forma soluble. El uso de medio de autoinducción, que se ha descrito que es eficaz para solubilizar proteínas con problemas de plegamiento al permitir que la expresión de la proteína sea más lenta, no resultó satisfactorio (43) (figura 10). Sin embargo el uso de la estirpe de *E. coli* pG-KJE8, una cepa bacteriana capaz de expresar chaperonas, que colaboran con el correcto plegamiento proteico y evitan la formación de cuerpos de inclusión (44), sí permitió alcanzar una cierta solubilización de la proteína. Al llevar a cabo la purificación de All7016 a partir de biomasa obtenida en esta estirpe se pudo recuperar una pequeña cantidad de proteína con un grado relativo de pureza (figura 11), que era suficiente para estudiar su unión al DNA *in vitro*. No obstante, es necesario optimizar la purificación de esta proteína, por ejemplo utilizando una columna de exclusión molecular para eliminar las proteínas contaminantes de las fracciones de purificación en las que había una mayor cantidad de All7016 pero también un mayor número de proteínas contaminantes.

6.3. Optimización de las condiciones de unión al DNA del regulador All7016

Dado que los estudios bioinformáticos habían puesto de manifiesto que All7016 era un regulador transcripcional de la familia LuxR se procedió a estudiar su actividad de unión a DNA *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel. Para ello, se empleó como DNA diana el promotor del propio gen *all7016*, ya que es muy común que este tipo de reguladores sean capaz de autorregularse (39). Se observó que la proteína All7016 tenía actividad de unión al DNA, ya que era capaz de formar complejos con el DNA, y que esta unión era específica, ya que solo formaba complejos con el fragmento de DNA correspondiente al promotor del gen *all7016* pero no con el DNA inespecífico (figura 13), lo que además evidenciaba que el regulador All7016 estaba autorregulado.

Al mismo tiempo, se ensayaron diferentes condiciones de unión y se observó que la proteína no sufría cambios relevantes en su actividad de unión al DNA (figura 13), lo que permitió concluir que el regulador no tenía carácter redox, ya que su unión no se veía afectada por la presencia de DTT, un agente reductor de puentes disulfuro. Además, también se determinó que la unión no se veía afectada por la presencia de iones metálicos ni se inhibe en presencia de agentes quelantes como el EDTA, lo que sugería que tampoco se trataba de un metalorregulador. Dado que los estudios bioinformáticos indicaron que el dominio GAF estaba potencialmente implicado en la unión de hemo, sería de interés analizar si la actividad de unión al DNA se ve afectada por la presencia de este compuesto, así como determinar los procesos celulares controlados por este regulador

7. Conclusiones

Tras la realización de este Trabajo de Fin de Grado se obtienen las siguientes conclusiones:

- Los estudios bioinformáticos permiten proponer que All7016 es un regulador transcripcional de la familia LuxR con un dominio GAF potencialmente implicado en la unión de hemo
- La sobreexpresión de All7016 en células de *E. coli* pG-KJE8 y su purificación mediante IMAC-Co²⁺ permite obtener la proteína All7016 con un relativo grado de pureza
- All7016 es capaz de unirse a su propia región promotora *in vitro* de forma específica, por lo que podría autorregular su propia expresión.
- La actividad de unión al DNA de All7016 no requiere condiciones reductoras ni iones metálicos, lo que sugiere que su unión al DNA no está controlada por el estado redox ni la presencia de metales

7. Conclusions

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

- Bioinformatics studies suggest that All7016 is a transcriptional regulator of the LuxR family with a GAF domain potentially involved in heme binding
- Overexpression of All7016 in *E. Coli* pG-KJE8 cells and purification via IMAC-Co²⁺ yields All7016 protein with a relative degree of purity
- All7016 is capable of binding to its own promoter region *in vitro* in a specific manner, and could therefore self-regulate its own expression
- The DNA binding activity of All7016 does not require reducing conditions or metal ions, suggesting that its DNA binding activity is not influenced by the redox state or the presence of metals

8. Bibliografía

1. Whitton BA, Potts M. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space: Springer Science & Business Media; 2007.
2. Green BR. After the primary endosymbiosis: an update on the chromalveolate hypothesis and the origins of algae with Chl c. *Photosynthesis research*. 2011;107:103-15.
3. Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC genomics*. 2012;13:1-17.
4. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*. 1979;111(1):1-61.
5. Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*. 2001;183(2):411-25.
6. Herrero A, Stavans J, Flores E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(6):831-54.
7. Flores E, Picossi S, Valladares A, Herrero A. Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2019;1862(7):673-84.
8. Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current opinion in biotechnology*. 2013;24(3):405-13.
9. Shcolnick S, Keren N. Metal Homeostasis in Cyanobacteria and Chloroplasts. Balancing Benefits and Risks to the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiology*. 2006;141(3):805-10.
10. 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. *Environmental Microbiology*. 2012;14(12):3175-87.
11. Bothe H, Schmitz O, Yates MG, Newton WE. Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;74:529 - 51.
12. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;546:41-52.
13. Kaushik MS, Singh P, Tiwari B, Mishra AK. Ferric Uptake Regulator (FUR) protein: properties and implications in cyanobacteria. *Annals of microbiology*. 2016;66:61-75.
14. Botello-Morte L, Pellicer S, Sein-Echaluce VC, Contreras LM, Neira JL, Abián O, *et al*. Cysteine Mutational Studies Provide Insight into a Thiol-Based Redox Switch Mechanism of Metal and DNA Binding in FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;24(4):173-85.
15. 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.
16. 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.
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 Microbiology Letters*. 2004;236(2):275-82.
18. Hernández JA, Peleato ML, Fillat MaF, Bes MT. Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters*. 2004;577(1-2):35-41.
19. Guío J, Sarasa-Buisan C, Velázquez-Campoy A, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML, *et al*. 2-oxoglutarate modulates the affinity of FurA for the *ntcA* promoter in *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Letters*. 2020;594(2):278-89.
20. Botello-Morte L, Bes MT, Heras B, Fernández-Otal Á, Peleato ML, Fillat MF. Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: Disulfide Reductase Activity Based on Its CXXC Motifs. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;20(9):1396-406.
21. Sein-Echaluce VC, Pallarés MC, Lostao A, Yruela I, Velázquez-Campoy A, Luisa Peleato M, *et al*. Molecular basis for the integration of environmental signals by FurB from *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochemical Journal*. 2018;475(1):151-68.
22. Napolitano M, Rubio Miguel Á, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson Nigel J, Luque I. Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Journal of bacteriology*. 2012;194(10):2426-36.

23. 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. *Environmental Microbiology*. 2015;17(6):2006-17.
24. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat María F. New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochemical Journal*. 2009;418(1):201-7.
25. Oliván-Muro I, Sarasa-Buisan C, Guío J, Arenas-Busto J, Sevilla E, Fillat MF. Unbalancing Zur (FurB)-mediated homeostasis in *Anabaena* sp. PCC7120: Consequences on metal trafficking, heterocyst development and biofilm formation. *Environmental Microbiology*. 2023.
26. 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 (ahr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Environmental Microbiology Reports*. 2014;6(5):468-75.
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 and Cell Physiology*. 2019;60(8):1778-89.
28. Sarasa-Buisan C, Guío 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. *Environmental Microbiology*. 2022;24(2):566-82.
29. Pis Diez CM, Juncos MJ, Villarruel Dujovne M, Capdevila DA. Bacterial Transcriptional Regulators: A Road Map for Functional, Structural, and Biophysical Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(4).
30. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 2000;69(1):183-215.
31. Pellicer S, Bes MT, González A, Neira JL, Peleato ML, Fillat MF. High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment. *Process Biochemistry*. 2010;45(2):292-6.
32. Ohmori M, Ikeuchi M, Sato N, Wolk P, Kaneko T, Ogawa T, *et al.* Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA research*. 2001;8(6):271-84.
33. Aravind L, Ponting CP. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997;22(12):458-9.
34. Zhang L, Guarente L. Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *The EMBO Journal*. 1995;14(2):313-20.
35. David A, Islam S, Tankhilevich E, Sternberg MJ. The AlphaFold database of protein structures: a biologist's guide. *Journal of Molecular Biology*. 2022;434(2):167336.
36. Brombacher E, Dorel C, Zehnder AJB, Landini P. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2003;149(10):2847-57.
37. Roggiani M, Dubnau D. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *Journal of bacteriology*. 1993;175(10):3182-7.
38. Lebediker M, Danieli T. Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*. 2014;588(2):236-46.
39. Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*. 1996;50(1):727-51.
40. Ho Y-SJ, Burden LM, Hurley JH. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *The EMBO Journal*. 2000;19(20):5288-99.
41. Royá Z, Jackie DC, Sharron HF. Properties and Functions of GAF Domains in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Other Proteins. *Molecular Pharmacology*. 2004;65(2):267.
42. Pellicer S, González A, Peleato ML, Martínez JI, Fillat MF, Bes MT. Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *The FEBS journal*. 2012;279(12):2231-46.
43. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 2005;41(1):207-34.
44. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, *et al.* Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(5):1694-9.

**MATERIAL
SUPPLEMENTARIO**

9. Material Suplementario

9.1. Programa utilizado en las reacciones de PCR

1. Desnaturalización inicial del DNA: 95 °C, 5 min
2. Desnaturalización: 95 °C, 30 s
3. Hibridación: 50 °C, 30 s
4. Extensión: 72 °C, 45 s
5. Elongación final: 72 °C, 10 min
6. Conservación del material amplificado: 4 °C

Repitiendo los pasos 2, 3 y 4 durante 30 ciclos.

9.2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de promotores mediante PCR

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Secuencia amplificada
Pall7016_up	GTACATATACACCCAGACCAAG	Promotor del gen <i>all7016</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
Pall7016_dw	GTAGTTCATGCTCACTAGGGG	
ifpkn22_up	AAAGATGAATTACTGGCG	Fragmento interno del gen <i>pkn22</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC7120
ifpkn22_dw	CTGCAAACGTGGCAGAATA	

Tabla S-1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR la región promotora del gen *all7016* y el DNA inespecífico utilizado en los ensayos de EMSA

9.3. Vector pET28 (Novagen)

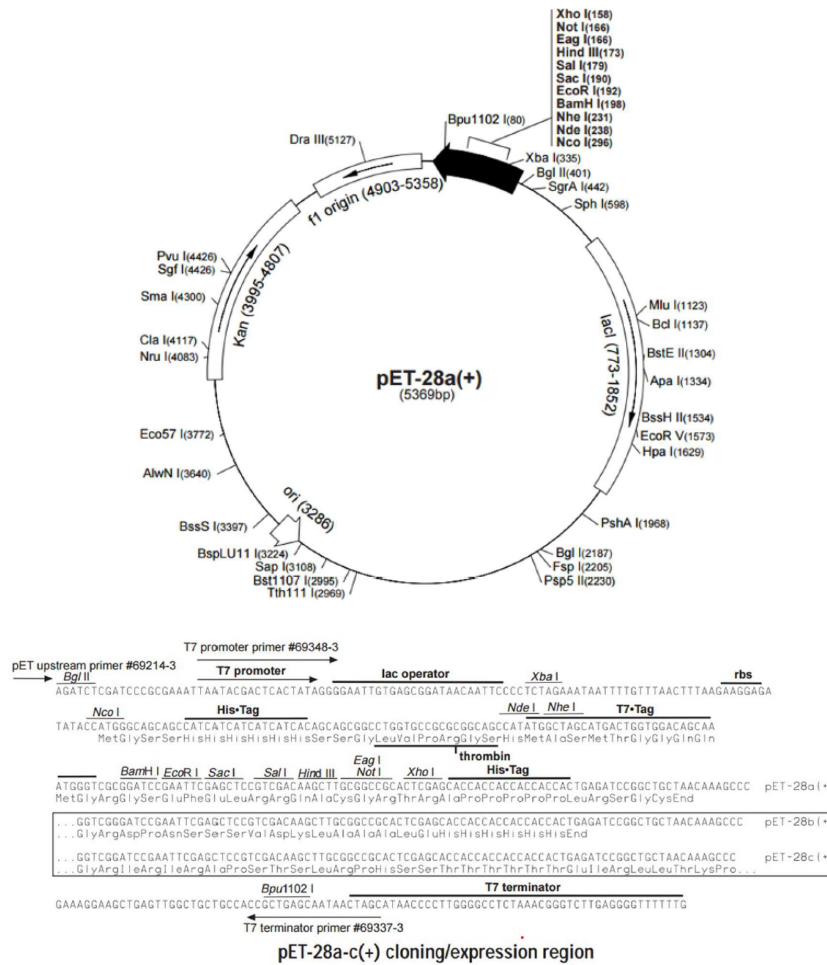


Figura S-1: Vector Pet28, comercializado por Novagen. Esta figura muestra la estructura y componentes del vector pET28, empleado en este trabajo para la expresión de una heteróloga en las cepas de *E. Coli* seleccionadas. El vector consiste en un promotor mixto, formado por una región operadora que se inhibe por el gen *lacI*, y por una región promotora constituida por el promotor del gen de la T7 RNA polimerasa. Presenta además, como todo vector, un polilinker y un marcador de selección, en este caso, de resistencia a la kanamicina.

9.4. Funcionamiento del sistema de inducción por IPTG en pET28

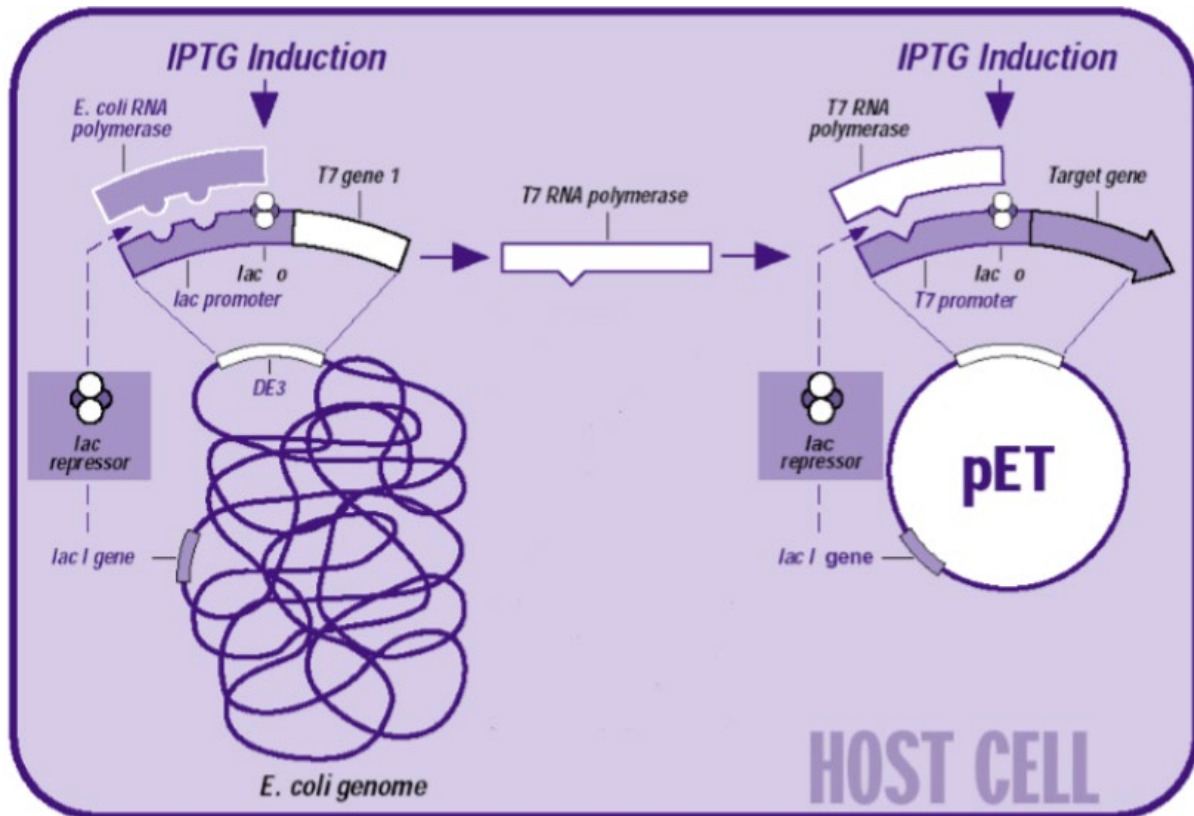


Figura S-2: Mecanismo de expresión del operador Lac, presente en el vector pET28, empleado para la expresión de la proteína All7016. Este sistema consiste en la utilización de un promotor híbrido en el vector pET, formado por el promotor T7 y el operador lacO, al que se une el represor codificado por lacI, presente en el vector. De esta manera, en situación basal, se expresa el gen lacI, que genera un represor, que no permite la unión de la T7 RNA polimerasa, necesaria para la expresión del gen introducido en el vector. Una vez se añade el inductor, IPTG (Isopropil β-D-1 tiogalactopiranososa, análogo de la lactosa), este se une al represor, permitiendo la expresión del vector. Asimismo, para que la utilización de este vector sea posible, es necesario utilizar cepas como E. Coli DE3, que cuentan con el locus DE3, que codifica la T7 RNA polimerasa, cuya expresión se encuentra reprimida por lacI siguiendo el mismo mecanismo que el explicado anteriormente, gracias a la presencia del promotor Lac, con su sitio lacO.

9.5. Composición de los geles de SDS-PAGE empleados en la electroforesis desnaturalizante

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

Tabla S-2. Composición de los geles desnaturalizantes SDS-PAGE**9.6. Composición de los geles nativos al 4% empleados en los ensayos de retardo en gel (EMSA)**

Reactivo	Gel 4 % EMSA
Agua destilada	6,23 mL
Acrilamida/bisacrilamida (30:0,8 p/v)	1,33 mL
Glicerol 50 % (v/v)	1,4 mL
Running buffer 10x (30,28 g/L Tris-HCl y 142 g/L glicina, pH 8)	0,93 mL
PSA 10 % (p/v)	50 μ L
TEMED	30 μ L

Tabla S-3. Composición de los geles no desnaturalizantes para EMSA

9.7. Secuencias de los homólogos del regulador All7016 de *Anabaena* sp. PCC 7120 en otras cianobacterias

>*Anabaena* PCC7120

MTIPLKLIFETINQAPSEHELRLQVVPQIGEYFGAKRYSIFFFEQLSLAADKNLQKILKIAL
SIEHNPIAHYLVERHAPVHEALVMSPKAWKVICPRQDHHVMAGPIINRNQIVGVVGCTREK
SMPAFDFTQNLTDLSSICLHLSVWAATVDSQSTATAKSHHYPFQSDACGGLRQHLTPRELQIA
QLVALGLTNAEIGHQLWITENSVKQALKRMFRKLVSSRAEMVAQLLARKHYSPEANLDTFY
LVPNSQQ

>*Calothrix* sp. 336/3

MISPLKLIFEAINQTRSQDELQLQVVPKIGEYFAAKRYSIFFFEQLPLAADKNLQKILKIAL
SIEHNPIARYLVERHAPVHEALVMSPKAWKVLCPRPDHHVMAGPIINRHQLVGVVGCTREK
SMPTFDTQNLTDLSSICLHLSVWTATVNTQPTVTAKSQHYPFQSDACGGLRQRLTPRELQIA
QLVASGLTNAEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLLARKHYSPEANLDSFY
LAPNSTSNL

>*Tolypothrix* sp. PCC 7910

MISPLKLIFEAINQTRSQDELQLQVVPKIGEYFAAKRYSIFFFEQLPLAADKNLQKILKIAL
SIEHNPIARYLVERHAPVHEALVMSPKAWKVLCPRPDHHVMAGPIINRHQLVGVVGCTREK
SMPTFDTQNLTDLSSICLHLSVWAATVNSQPNGTAKSQHYAFQSDACGGLRQRLTPRELQIA
QLVASGLTNAEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLLATKHYSQANLDSFS
LAPNSTSNL

>*Roholthiella* sp. LEGE 12411

MTSPLKLLFEAINQACSEHDLRSQVVPKIGEYFAAKRWGIFFFDQLPLADSNLQKILKIVLS
IEHNPVARYLVERHAPVHEALVTSPKAWKTICPRPDHHVMAGPIVNRNQLVGVVGCTREKS
MPAFDTPNLTDLAICLHLSVWAATVGSQGISAGELQHQSFKTDRLTPRELQIAELVALGQT
NAVIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSVTKYHSPQANPDSFNLVLNSHQ

>*Myxacorys chilensis* ATA2-1-K014

MTSPLKLLFEAINQAHSEHEVRSHVVPKIGEYFSATRWGVFFFDQLPLADSNFQKILKVGLS
IEHNPVVRYLVERHAPVHEALVTSPKAWTIIICPRPDHHVMAGPIINGGQLVGVVGCTREERA
MPAFDFTQNLADLSAICLHLSVWAATVRSQGVSNKSRQQPFRTNRLTPRELQIAELVALGRT
NAGIGTELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSATRHGSPEANLSAFNLVLNSDS

>*Brasilonema* sp. CT11

MTSSLGFLFEAINQAHSEHDLRLQIVPKIGEYFAAKRCGIFFFDQLPLTDRNLQKILKIALS
IEHNPVARYLVERHAPVHEALVTSPKAWKLICPRPDHHVMAGPIINRGQLVGVVGCTREKS
MPVFDFTQNLVDLSAICLHLSVWTATMRSQSVCSAGKSLPPSFRSNRLTPRELEIAELVALGRT
NAEIGTELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLLATGHDSSEVNLSAFNLVLNSHQ

>*Scytonema tolypothrichoides*

MTSSLGFLFEAINQAHSEHDLRLQVVPKIGEYFAAKRWGIFFFDQLPLTDRNLQKILKIALS
IEHNPLARYLVERHAPVHEALVTSPKAWKLICPRPDHHVMAGPIINRGQLVGVVGCTREKS

Material Suplementario

MPAFDAQNLVDLSAICLHLSVWAATVRSQSVSGGKSLPPSFRTNRLTPRELQIAQLVALGRT
NAEIGTELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLLATRHVATQGKL

>Crinalium epipsammum

MTSPLKFLFETIDQAHSEDEMRSQIVPQIGEYFVAKRCAIFFFDQLPNLNKNLQKILKIGLS
VEHNPVVRYLVERHAPVHEALVMSPKAWTIICPRPDHWHVMAGPIINRGQLVGVVGCTREKS
MPAFDTQNLADLSAICLHLSVWVTTVRSCSNSKELSQHQPIGGSRLTPREMQIAQLVALGRT
NAEIGNELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLFAVRQYS

>Microcoleus asticus

MTISLQLLFKEIDQVTDEQDLRSQVVPKIGEYFATKRSGIFFFDQLLADRNLQKLLKVALSV
EHNPVARYLAERHTPVHEGLVTSPKAWAIICPRPDHWHVMAGPIVNRGQLVGVVGCTREQSM
PAFDTQNLADLSAMCLHLSVWAATVRSRSVSVGEACPTGIGKSQHQSFKSDRLTPRELQIAE
LVALGRTNAEIGRELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSATKYHLPSVKMSPSNL
MQNTHQ

>Fischerella sp. NIES-4106

MTSSLDLFEAIRQTCSKSDLRSQVAPKIGEYFGAKRWAIFFFDQLPLNDRNLQKILKIALSI
EHNPVARYLAERHAPVHEALVTTPKAWKLICPRPDHWHVMAGPIINHGQILGVVGCTREKAM
PAFDSENLDLSAICLHLSVWVATVGSQGI FAENSQHQLFNSDFFRDGKAKRLTPRELQIAE
LVALGRTNAEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSGIRLHSSGANPDSFNS
VLNSY

>Coleofasciculus sp. FACHB-712

MTSSLESLLSAIRQTHSKSDLRSQIAPKIGEYFAAKRWAIFFFDQLPLSDRNFQKILKIALS
IEHNPVARYLAERYAPVHEALVTTPKTWKLICPRPDHWHVMAGPIINQGQIVGVVGCTREKI
MPAFDSENLDLGAICLHLSWVATVDSQSLFAGKSQHQPFNNGFLQNGKAERLTPRELQIAE
ELVALGQTNAEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSNTRLHSSRANSDFN
SVLNSHSSPFGCVFTKD

>Trichocoleus sp. FACHB-90

MTSPLEPLLSAIRQTYSKSDLRAQIAPKIGEYFAAKRWAIFFFDQLPLSDRNFQKILKVALS
IEQNPVARYLAERYAPVHEALVTTPKAWKLICPRPDHWHVMAGPIINHGQIVGVVGCTREKA
MPAFDSENLDLGAICLHLSGWVATVGSEGI FAGKSQQQRFNSGFLHNGKAERLTARELEIA
QLVALGQTNAEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLSDTRFRSWEANSDFN
SVLNSH

>Chroococciopsis sp. CCME 29

MTSPLQLLFEAIYQAQSEHGLRTHIVPAIGEYFAAKRSGIFFFDQLPFADRNLQKVLNIALS
IEHNPVARYLAEHSPVHEGLVTSPKAWKIICPRPDHWHVMAGPIVDRGQLVGAVGCTRERS
MSAFDAQNLADLSAVCLHLSVWTATVRLAQSETPKQPQHQPFKSDRLTPRELQIAELVALGR
TNAEIGTELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSAPQNIKSLHWVRSI

>Oscillatoria nigro-viridis

MKSSLQLLFEAIEQVKDEQDLRSQVVPKIGEYFAAKRSGIFFFDRLPLVDSKLQKTLKVALS
 IEHNPVARYLVERHSPVHEALVASPKVWTIICPRPDHWHVMAGPIVSRGQLMGVVGCTRDRS
 MPAFDTENLADLSAICLHLSVWAATVRAAELSRRESQHQPLKTSRLTPRELQIAELVALGRT
 NAGIGRELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSTTYNLPSVKSSPANLVQNTQQ

>Oculatella sp. FACHB-28

MTSSLKLLFEAISQTQSEQDMRSQIVPKIGEYFAATRWDGIFFFDQLPLVDRNLQEALKVGLS
 VKHNPIVRYLVERHAPVHEALVTSPKAWSIICPRPDHWHVMAGPIINRGQLVGVVGCTREKS
 KSAFDTQNLADLSAICLHLSVWVTAVRSQSTSPERASLSRGKAPKNCLTPRELQIAELVALG
 RTNAEIGSELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLTDFASPRLG

>Leptolyngbya sp. FACHB-541

MTSSLKLLFEAISQTQSEQDMQSQIVPKIGEYFAATRWDGMFFFDQLPLVDRNLQEVKLVGLS
 VKHNPIVRYLVERHAPVHEALVTSPKAWSIICPRPDHWHVMAGPIINRGQLVGVVGCTREKS
 KSAFDTQNLADLSAICLHLSVWVTAVRSQSTSPERASLSRGKAPKNCLTPRELQIAELVALG
 RTNAEIGSELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLTDFASPRLG

>Kovacicikia minuta

MTSSLKLLLEAIDRTPDEQDLRSQIVPQIGAYFAAKRGGIFFFDQLFLNDPRLQKTLVSVALS
 LEHNPVAKYLVERHTPVHEALVTSPKTWRMICPRPDHWHVMAGPIIDRNQLVGAVGCTRDRS
 MPAFDTPNLVDL SAVCLHLSVWAVTVRGQVSPGVTD PANITRSQSQPTKTD FPWNGKVDRL
 TPRELQIAELVALGRTNKEIGNQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLAATAQSLK
 DGVT SIGNEASM

>Phormidium sp. FACHB-592

MLSLQLLFEKINQLKNEHDLRTDIAPKLGEYFAATRSAIFFFDQIVADKKLQKALQVALSIE
 HNPVARYLAERHTPVHEGLVTSPKAWALICPRPDHWHVMAGPIVSHGQLVGTVGTREKSM
 AFDTQNLADLSGICLHLSVWAATVRSQAVYVGEAHPDEGKSQHQLRSELLSEQLCQRLTPR
 ELQIAALVGLGRTNAEIGKELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLGAGITFAPKTT
 V

>Gloeocapsopsis dulcis

MTSSLQLLFTAINQAKDEQDLRSQVVLKIGEYFAAKRWGIFFFDQLPLADRNFQKTLQIGLS
 IKHNPVVRYLVERHAPVHEALVSPKAVWTMICPRPDHWHVMAGPIVSDGQLVGVVGCTREQS
 MLAFDTQNLADLSAICLHLSVWAATVRLRSISTELQQQCYKSDRLTPRELQIAELVALGLTN
 AEIGNELWITENSVKQALKRIFRKLGVSSRAQMVAQLFATKPRDFQA

>Lyngbya sp. CCAP 1446/10

MTNSLKHIFEVINQVKNEQDLRSQVVPKIGEYFAAKRSGVFFFDRLPLVNSNLQKTLQNGLS
 IEHNPVVRYLVERHAPVHEALVASPKVWTMICPRPDHWHVMAGPIVSCGQLVGVVGCTREQS
 MPAFDAQNLADLSAICLHLSVWTATVRSQYQPFKTDRLTSRELQIAELVALGRTNAEIGTEL
 WITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAQMVAQLSATKHHLPSVKQSLSDLVLTNDQ

>Stenomitos frigidus

Material Suplementario

MTSPLQLLFETINQASSEADLRSHLAPKLGDYFAAKRSGIFFFDQLKAARKFQNILNVALSI
EHNPVARYIAERHTPVHEGLVTS PKAWAVICPRPDHWHVMAGPIIDRGQLVGAVGCTREKSM
LAFDTQNLADLSAICLHLSVWAATVRS LHQTATTDCYGNSKAGCLTPREWQIAQLVALGQTN
AEIGAELWITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLATQNNTHRVPASS

>*Tychonema* sp. LEGE 07203

MKSPLQLLFEAIDQVKDEQDLRSHLAPKIG EYFAAKRSGIFFFDRLPSLDSNLQKTLKVALS
IEQNPLARYLVERHAPVHEALVTS PKVWTMICPRPDHWHVMAGPIVNRGQLAGVVGCTREQS
MFAFDTQNLADLSAICLHLSVWAATVRFQHQPFKSDRLTSRELEIAELVALGR TNAQIGKEI
WITENSVKQALKRMFRKLEVSSRAEMVAQLSATKYHLSLKNALLAEQ

>*Aetokthonos hydrillicola*

MAISLQFLFGAINQAQDEQELRSQVLPKINEYFVVKRYGIFFFDQLPFKDSKLQKTLQIGLS
IEHNPVVRYLVERHAPVHEGLVVS PKIWTMICPRPDHWHVMAGPIVSRGKLVGVVGCTREQS
MPAFDSQNLADLSAICLHLSTWAATVRSQNVCEGKLQKGI EKSDRLTPRELQIAELVALGR T
NAQIGKELWITENSVKQALKRIFRKLEVSSRAEMVAQLYTTKY

>*Hydrococcus* sp. RU_2_2

MTSALQRIFEAIEQGEDEQNLRSQVVPKIG EYFATKRQGLFFFDQLPFTDKNLQKTLQIAFS
IEYNPVVRYLVERHAPVHEALVTS PKIWTMICPRPDHWHVMAGPIVSQGKLVGAIGCTRERS
MPAFEAQNLADLSAICLHLSVWMATARSRSVFAVQAQHHSFKSDCLTPRELEIAQLVALGR T
NAEIGQQLWITENSVKQALKRMFRKLEVSCRAQMVARLSIDER

>*Nodosilinea* sp. FACHB-13

MTTSLKLLFEGIHQAEDEDSLRSQ LAPQLGEYFAAKRSGIFFFDQLLVDQKFQTVLNLALS L
EHNPVARYIAERHTPVHEGLVTTPKAWKLICPRPDHWHVMAGPIVDRGQVVG SVGCTREKSM
PAFDTQNLADLSAVCLHLSAWTASVRLTRSTTPQPQHQSFN TSRLTPRELQIADLVALGR TN
AEIGNELWITENSVKQALKRMFRKLVSSRAELVAQISAMQPHFSK

>*Chlorogloeopsis fritschii*

MTISLKLLFEEIYQAKDEEDLRSHLAPKIG EYFVAKRSGIFFFDRLPAEQTLQKVLNIALSL
EHNPIARYIAERHTPVHEGLVTTPKAWKLICPRPDHWHVMAGPIVNRAQVVG SVGCTREKSM
PAFDTQDLADLSAICLHLSAWTASLRFAQSAALEPQHQSFTINRLTPRELQIANLVALGR TN
AEIGNELWITENSVKQALKRMFRKLVSSRTEMVAQIYIK

>*Limnothrix* sp. FACHB-881

MTISLKLLFEEIHKAKDEDSLQSQLAPKIG NYFAAKRSGIFFFDQLLADQKFQAILNVALSL
EHNPVARYIAERHTPVHEGLVTIPKTKWKLICPRSDHWHVMAGPIIDRGQVVG SVGCTREKSM
SAFDTQDLADMSAICLHLSAWTARVRIIRSTTLQPQHQSFSNRLTPRELQIANLVALGR TN
AQIGSELWITENSVKQALKRMFRKLVSSRAEMIAQLSATKHHLSSLELVNKHQ

9.8. Árbol filogenético del regulador All7016 de *Anabaena* sp. PCC 7120 con sus homólogos en otras cianobacterias

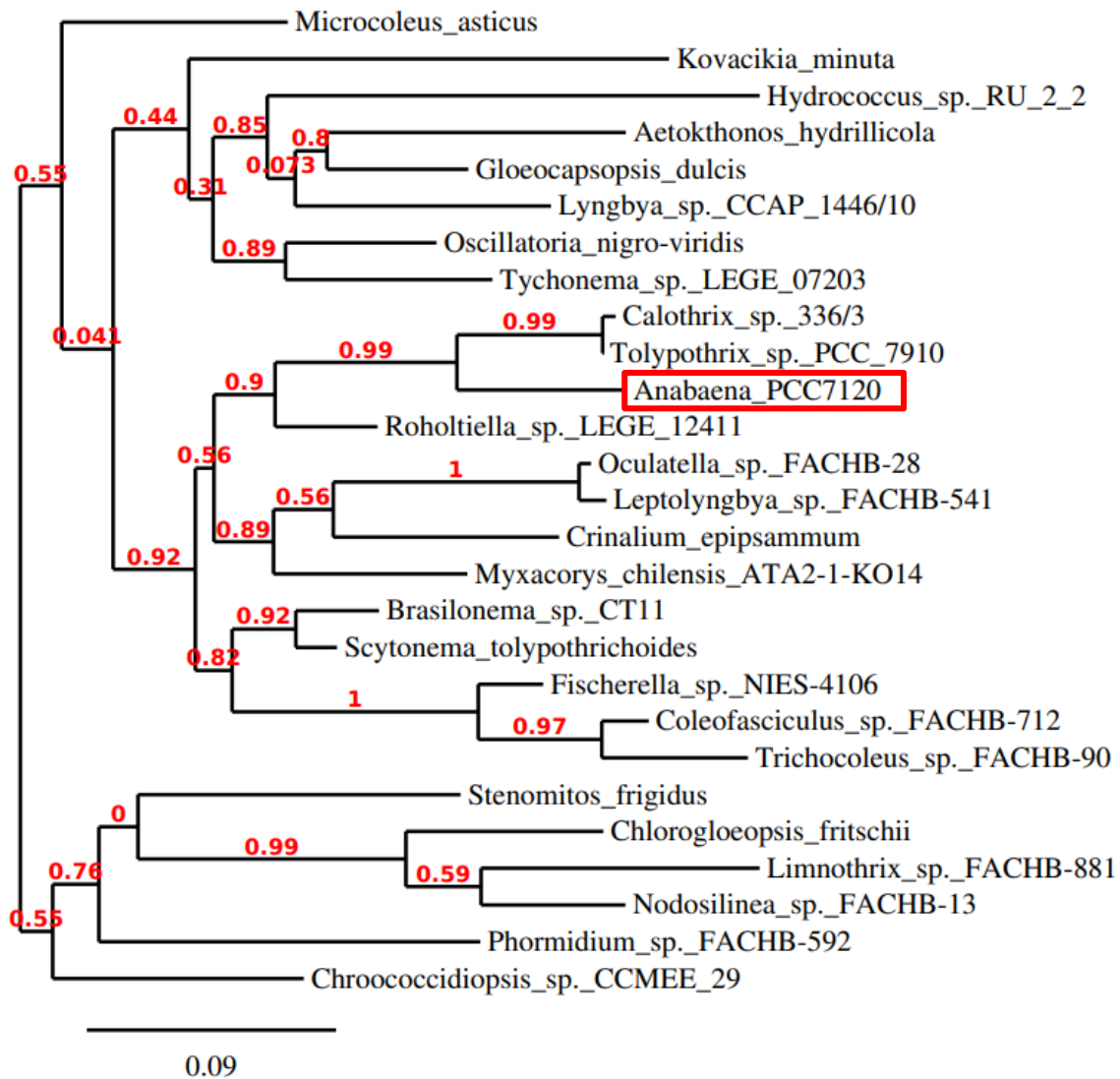


Figura S-3: Árbol filogenético del regulador transcripcional All7016 de *Anabaena* sp. PCC7120 con sus homólogos en otras cianobacterias. Este árbol ha sido generado utilizando las secuencias de homólogos presentes en el apartado 8.7. El alineamiento se genera mediante ClustalW, que se cura mediante GBlocks, y finalmente se realiza el árbol mediante PhyML, visualizándolo con la herramienta TreeDn. Aparece recuadrada en rojo la rama perteneciente a *Anabaena*. También en rojo se encuentran los datos de aLTR (approximate Likelihood-Ratio Test), que informa de la probabilidad de que la relación evolutiva establecida sea cierta, siendo este valor 0 en el caso de que el programa haya inferido la rama en cuestión.

9.9. Alineamiento múltiple del regulador All7016 de *Anabaena* sp. PCC 7120 con sus homólogos en otras cianobacterias

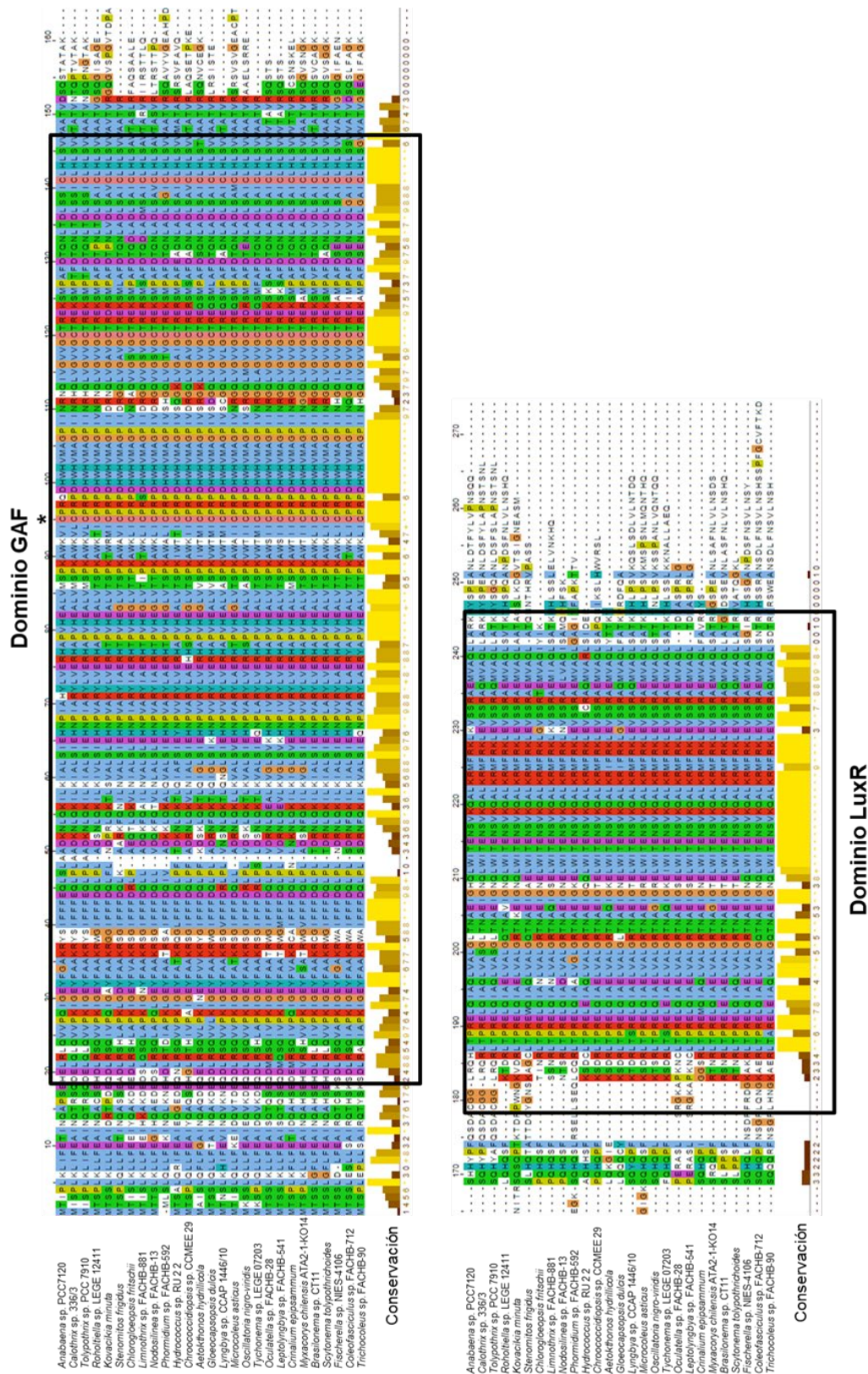


Figura S-4: Alineamiento múltiple de los homólogos de All7016 en otras cianobacterias. Imagen generada mediante JalView del alineamiento múltiple (MUSCLE) de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de All7016. Aparecen coloreadas siguiendo un código Clustal, y se encuentran recuadrados los dominios GAF, y de unión de DNA tipo LuxR.

9.10. Secuencias de reguladores transcripcionales de la familia LuxR en otros procariotas

```
>All7016_[Anabaena_sp._PCC_7120]
MTIPLKLI FETINQAPSEHELRLQVVPQIG EYFGAKRYSIFFFEQLSLAADKNLQKILKI
ALSIEHNPIAHYLVERHAPVHEALVMS PKAWKVICPRQDHWVMAGPI INRNQIVGVVGC
TREKSM PAFDTQNLTDLSSICLHLSVWAATVDSQSTATAKSHHYPFQSDACGGLRQHLTP
RELQIAQLVALGLTNAEIGHQLWITENS VKQALKRMFRKLVSSRAEMVAQLLARKHYSP
EANLDTFYLV PNSQQ
```

```
>TodT_[Pseudomonas_putida]
MPARWGCLFP GKYP CQTGLRHMSDRASVIY I LDDDNAVLEALSSLVRSIGLSVECFSSAS
VFLNDVNR SACGCLILDVRMP EMSGLDVQRQLKELGEQIPIIFISGHGDI PMAVKAIKAG
AVDFFTKPFR EEEELLG AIRAALKLAPQQRSNAPRVSELKENYESLSKREQQVLK FVLRGY
LNKQTALELDI SEATVKVHRHNIMRKM KVSSIQDLVRVTERLKDSLE
```

```
>NarL_[Escherichia_coli]
MSNQEPATILL IDDH PMLRTGVKQLI SMAPDITVVG EASNGEQGIELAESLDPDLILLDL
NMPGMNGLET LDKLREKSLSGRIVVFSV SNHEEDVVTALKRGADGYLLKDM EPEDLLKAL
HQAAAGEMVL SEALTPVLAASLRANR ATTERDVNQ LTPRERDILKLI AQGLPNKMIARRL
DITESTVKVHV KHM LKKM KLSRVEAAV VVHQERIF
```

```
>RcsB_[Escherichia_coli]
MNNMNVI IADDP I VLF GIRKSLEQIEWVNVV GEFEDSTALINNL PKLDAHVLI TDLSMP
GDKYGDGIT LIKYIKRHFPSLSI I VLT MNNNPAILSAVLDLDIEGIVLKQGAPTDL PKAL
AALQKGKKFT PESVSRLLEKISAGGYGDKRLSPKESEVLR LFAEGFLVTEIAK KLNRSIK
TISSQKKSAMMKLGVENDIAL LNYLSSVTLSPADKD
```

```
>RcsA_[Escherichia_coli]
MSTIIMDLCSYTRLGLTG YLLSRGVKKREINDIETVDD LAIACDSQRPSVVF INEDCFIH
DASNSQRIKLI INQHPNTLFIVFMAIANVHFDEYLLVRKNLLISSKSIKPESLDDILGDI
LKKETTIT SFLNMPTLSLSRTESSMLRMW MAGQGTIQISDQMNIAKTVSSHKGNIKRKI
KTHNKQVIYHV VRLTDNVTNGIFVNMR
```

```
>DegU_[Bacillus_subtilis]
MTKVNIVI IDDHQLFREGVKRILDFEPTFEVVAEGDDGDEAARIVEHYHPDVVIMDINMP
NVNGVEATKQLVELYPESKVII LSIHDDENYVTHALKTGARGYLLKEMDADTLIEAVKVV
AEGGSYLHPKVTHNLVNEFRRLATSGVSAHPQHEVYPEIRRPLHILTRRECEVLQMLADG
KSNRGIGESL FISEKTVKNHVSNI LQKMNVDRTQAVVVAIKNGWVEMR
```

```
>LasR_[Pseudomonas_aeruginosa]
MALVDGFLELERS SSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW
REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLP I FWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLT MPLHG
ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP TLWMLKDYALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT SR
EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI RRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL
```


Material Suplementario

>CsgD_[*Escherichia_coli*]
MFNEVHSIHGHTLLLITKSSLQATALLQHLKQSLAITGKLNHNIQRSLDDISSGSIILLDM
MEADKCLIHYWQDTLSRKNNNIKILLNTPEDYPYRDIENWPHINGVFYSMEDQERVVNG
LQGVLRGECYFTQKLASYLITHSGNYRYNSTESALLTHREKEILNKLRI GASNNEIARSL
FISENTVKTHLYNLFKKIAVKNRTQAVSWANDNLRR

>_RhIR_[*Pseudomonas_aeruginosa*]
MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRRLGFDYAYGVRHTIPFTRPKTEV
HGTYPKAWLERYQMQNYGAVDPAILNGLRSSEMVVWSDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGA
TLP IRAPNNLLSVLSVARDQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDL EHPMLMSNPVC
LSHRE REILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKTLAAAYAAALGL
I

>DevR_[*Mycobacterium_tuberculosis*]
MVKVFLVDDHEVVRRLVLDLLGADPELDVVGEAGSVAEAMARVPAARPDVAVLDVRLPDG
NGIELCRDLLSRMPDLRCLILTSYTSDEAMLDAILAGASGYVVKDIKGMELARAVKDVGA
GRSLLDNRAAAALMAKLRGAAEKQDPLSGLTDQERTLLGLLSEGLTNKQIADRMFLAECT
VKNYVSRL LAKLGMERRTQAAVFATELKR SRPPGDGP

>RamR_[*Streptomyces_coelicolor*]
MGEMVRIAVVHDEKLLRSALVQLLRSDDTLDVSSHCLDADGPELSAALPADVCVVDGECL
TGPEDAGAGRLRARYGDRVLV LATAKRPGLVRRAFDGGALGLVDKNAPAHRLITAVHTVA
RGERFLDETTLTVAL LKGAEMPLTTRELGVLT LASQGAPIAEIAARLHLSRGTVRNYMATA
VRKVGARNRVDAIRIVQSAGWT

>EvgA_[*Escherichia_coli*]
MNAIIIDDHPLAIAAIRNLLIKNDIEILAEELTEGGSAVQRVETLKPDIVIDVDIPGVNG
IQVLET LRKRQYSGIIIVSAKNDHFY GKHCADAGANGFVSKKEGMNIIAAIEAAKNGY
CYFPFSLNRFVGS L TS DQQKLD SLSKQEISVMRYILDGKDNNDIAEKMFISNKT VSTYKS
RLMEKLECKSLMDLYTFAQRNKIG

>UvrY_[*Escherichia_coli*]
MINVLLVDDHELVRAGIRRILEDIKGIKVVGEASCGEDAVKWCRTNAVDVVLMDMSMPGI
GGLEATRKIARSTADVKIIMLTVHTENPLPAKVMQAGAAGYLSKGAAPQEVVSAIRSVYS
GQRYIASDIAQQMALSQIEPEKTESPFASLSERELQIMLMITKGQKVNEISEQLNLSPKT
VNSYRYRMFSKLN IHGDVELTHLAIRHGLCNAETLSSQ

>UhpA_[*Escherichia_coli*]
MITVALIDDHLIVRSGFAQLLGLPELDQVVAEFGSGREALAGLPGRGVQVCICDISMPDI
SGLELLS QLPKGMATIMLSVHDS PALVEQALNAGARGFLSKRCSPDELIAAVHTVATGGC
YLTPDIAIKLASGRQDPLTKRERQVAEKLAQGM AVKEIAAELGLSPKTVHVHRANLMEKL
GVSNDVELARRMFDGW

>FixJ_[*Rhizobium_meliloti*]

MTDYTVHIVDDEEPVRKSLAFMLTMNGFAVKMHQSAEAFALAFAPDVRNGVLVTDLRMPDM
SGVELLRNLGDLKINIPISIVITGHGDVPMAVEAMKAGAVDFIEKPFEDTVIEAIERASE
HLVAAEADVDDANDIRARLQTLSENERQVLSAVVAGLPNKSIAYDLDISPRTVEVHRANV
MAKMKAKSLPHLVRMALAGGFGPS

>BglJ_[*Escherichia_coli*]

MEHSRIKKRNVALIEKCVMS SIGIESLFRKFAGNPYKLHTYTSQESFQDAMSRISFAAVI
FSFSAMRSEERREGLSCLTELAIKFPRTRRLVIADDDIEARLIGSLSPSPLDGVLSKASTL
EIFHQELFSLNNGVRQATDRLNNQWYINQSRTLSPTEREILRFMSRGSMTQIAEQKRN
IKTIRAHKFNVM SKLGVSSDAGLLEAADILLCMRH CETSNVLHPY

>VraR_[*Staphylococcus_aureus*]

MTIKVLFVDDHEMVRIGISSYLSTQSDIEVVGEGASGKEAIAKAHELKPDILMDLLMED
MDGVEATTQIKKDLPOIKVLM LTFIEDKEVYRALDAGVDSYILKTTSAKDIADAVRKT
RGESVFEPEVLV KMRNRMKKRAELYEM LTEREMEILLIAKGYSNQEIASASHITIKTVK
THVSNILSKLEVQDRTOAVIYAFQHNLIQ

>AnoR_[*Acinetobacter_nosocomialis*]

MESWQEDLLSAFLVVKNEDELFEVVKSTASKLGFYDCA YGMQSPLSIAEPKTI MLNNYPQ
AWQKRYIEQRYVKVDPTVQHCMVSLQPLVWSSQNAKTQEEKDFWEEARSYGLNVGWAQSS
RDFIGTRGMLTLARSTDQLSEKEQKAQYTNMYWLTQTVHSSIAKIVNDVEFSQFNLYLTN
REKEALRWTAEGKTSAEIAQIIGVTERTVNFHLCNSMQKLVN NKSAAIRAVMLGLL

>EcpR_[*Escherichia_coli*]

MTWQNDYSRDYEVKNHMECQNRSDKYIWSPHDAYFYKGLSELIVDIDRLIYLSLEKIRKD
FVFINLNTDSLTEFINRDNEWLSAVK GKQVVLIAARKSEALANYWYNSNIRGVVYAGLS
RDIRKELAYVINGRFLRKDIKKDKITDREMEIIRMTAQGMLPKSIARIENCSVKTVYTHR
RNAEAKLYSKLYKLVQ

>LiaR_[*Bacillus_subtilis*]

MIRVLLIDDHEMVRMGLAAFLEAQPDI EVI GEASDGSEGVRLAVELSPDVILMDLVM EGM
DGIEATKQICRELSDPKII VLT SFIDDDKVYPVIEAGALS YLLKTSKAAE IADAIRAASK
GEPKLESKVAGKVL SRLRHSGENALPHE SLTKRELEILCLIAEGKTNKEIGEELFITIKT
VKTHITNILSKLDVSDRTQAAVY AHRNHLVN

>DesR_[*Bacillus_subtilis*]

MISIFIAEDQQMLLGALGSLNLEDDMEVVGKGT TGQDAVDFVKKRQPDVCIMDIEMPGK
TGLEAAEELKDTGCKIIILTT FARPGYFQRAIKAGVKGYLLKDSPSEELANAIRSVMNGK
RIYAPELMEDLYSEANPLTDREKEVLELVADGKNTKEIAQELS IKS GTVRNYI SMILEKL
EVKNRIEAITRSKEKGWFK

>SdiA_[*Escherichia_coli*]

MQDKDFFSWRRTMLLRFRQRMETAEVYHEIELQAQQLEYDYSLCVRHPVPFTRPKVAFY
TNYPEAWVSYYQAKNFLAIDPVLN PENFSQGHLMWNDLDFSEAQPLWEAARAHGLRRGVT

QYLMPLPNRALGFLSFSRCSAREIPILSDELQMKQLLVRESLMALMRLNDEIVMTPEMNF
SKREKEILRWTAEGKTSAEIAMILSISENTVNFHQKNMQKKINAPNKTQVACYAAATGLI

>ComA_[*Bacillus_subtilis*]

MKKILVIDDHPAVMEGTKTILETDSNLSVDCLSPPEQFIKQHDFSSYDLILMDLNLGG
EVNGMELSKQILQENPHCKIIIVYTGVEVEDYFEEAIRAGLHGAI SKTESKEKITQYIYHV
LNGEILVDFAYFKQLMTQQKTKPAPSSQKEQDVLTPRECLILQEVEKGFNTQEIADALHL
SKRSIEYSLTIFNKLNVGSRTEAVLIAKSDGVL

>NarP_[*Escherichia_coli*]

MPEATPFQVMIVDDHPLMRRGVRQLLELDPGSEVVAEAGDGASAIIDLANRLDIDVILLDL
NMKGMSGLDTLNALRRDGVTQAQIIILTVSDASSDVFALIDAGADGYLLKDS DPEVLLEAI
RAGAKGSKVFSERVNQYLREEMFGAEEDPFSVLTERELDVLHELAQGLSNKQIASVLNI
SEQTVKVHIRNLLRKLNVRSRVAATILFLQQRGAQ

>TraR_[*Rhizobium_radiobacter*]

MQHWLDDKLTDLAAIEGDECILKTGLADIADHFGFTGYAYLHIQHRHITAVTNYHRQWQST
YFDKKFEALDPVVKRARSRKHI FTWSGEHERPTLSKDERAFYDHASDFGIRSGITIPIKT
ANGFMSMFTMASDKPVIDLDREIDAVAAAATIGQIHARISFLRTTPTAEDA AWLDPKEAT
YLRWIAVGTKMEEIADVEGVKYNVSVRVLKREAMKRFDVRSKAHLTALAIRKLI

>LuxR_[*Aliivibrio_fischeri*]

MNIKNINANEKIIDKIKTCNNNKDINQCLSEIAKIIHCEYYLFAI IYPHSI IKPDVSIID
NYPEKWRKYDDAGLLEYPDVDYKSHSPINWNVFEKKTIKKESPNVIKEAQESGLIT
GFSFPIHTASNGFGMLSFAHSDKDIYTDLSLFLHASTNVPLMLPSLVDNYQKINTTRKKS
SILTKREKECLAWASEGKSTWDISKILGCSERTVTFHLTNTQMKLNTTNRCSISKAILT
GAINCPYLKN

>DctR_[*Escherichia_coli*]

MFLIITRDTMFFTAMKNILSKGNVVIHQNEEIDVMLHQNAFVIIDTLMNNVFHSNFLTQ
IERLKPVHVIIIFSPFNKRCLGKVPVTFVPRITIIDFVALINGSYCSVPEAAVSLSRKQ
HQVLSCIANQMTTEDILEKLIKSLKTFYCHKHNIMMILNLKRINELVRHQHIDYLV

>GadE_[*Escherichia_coli*]

MIFLMTKDSFLLQGFWQLKDNHEMIKINSLSEIKKVGKNPKFKVIIDTYHNHILDEEAIKF
LEK LDAERIIVLAPYHISKLKAKAPIYFVSRKESIKNLEITYGKHLPHKNSQLCF SHNQ
FKIMQLLILKNKNESNITSTLNISQQTLKI QKFNIMYKLLRMSDIVTLGITSYF

>LnrK_[*Bacillus_subtilis*]

MIKIIITDDQDIVREGLASLLQLREELDVIATARNGQEA FEKAKELEPDIVLMDIRMPVS
NGVEGTKLITSSLPVSVKVLMLTTFKDSALIAEAELEEGASGYLLKDSADTIVKAVMTVHS
GGMVLPPELTAQMLNEWKREKQLKGINEIEKPNELDLTEREIEVLAELGYGLNNKEIAE
KLYITEGTVKNHVSNIISKLA VRDRTQA AIYSVRYGVSVF

9.11. Árbol filogenético del regulador All7016 de *Anabaena* sp. PCC 7120 con reguladores transcripcionales de la familia LuxR en otros procariotas

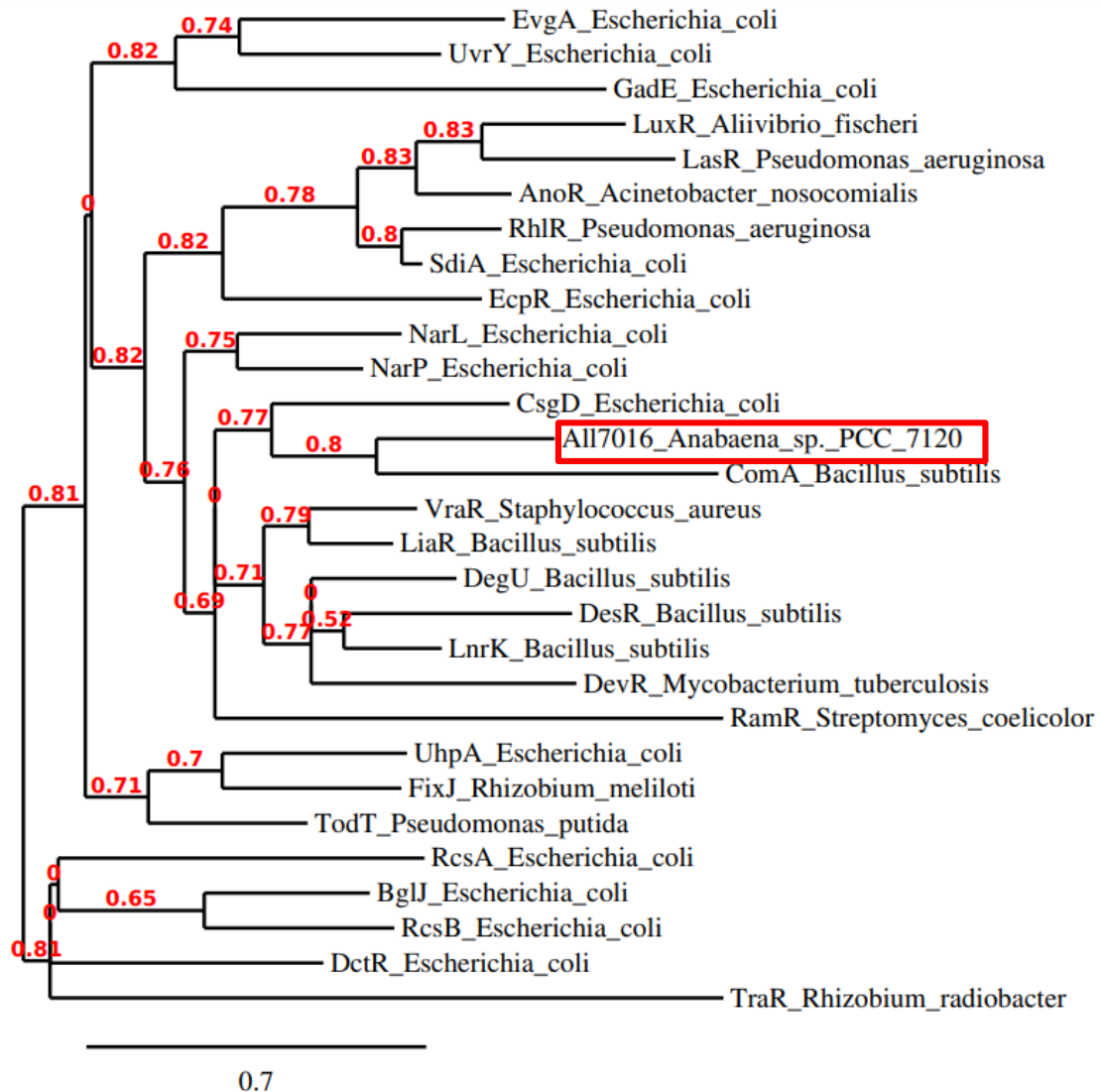


Figura S-5: Árbol filogenético del regulador transcripcional All7016 de *Anabaena* sp. PCC7120 con sus otros miembros de la familia LuxR presentes en procariotas no pertenecientes al filo cianobacteria. Este árbol ha sido generado utilizando las secuencias de homólogos presentes en el apartado 8.10. El alineamiento se genera mediante ClustalW, que se cura mediante GBlocks, y finalmente se realiza el árbol mediante PhyML, visualizándolo con la herramienta TreeDn. Aparece recuadrada en rojo la rama perteneciente a *Anabaena*. También en rojo se encuentran los datos de aLTR (approximate Likelihood-Ratio Test), que informa de la probabilidad de que la relación evolutiva establecida sea cierta, siendo este valor 0 en el caso de que el programa haya inferido la rama en cuestión.

9.12. Alineamiento múltiple del regulador All7016 de *Anabaena* sp. PCC 7120 con reguladores transcripcionales de la familia LuxR en otros procariotas

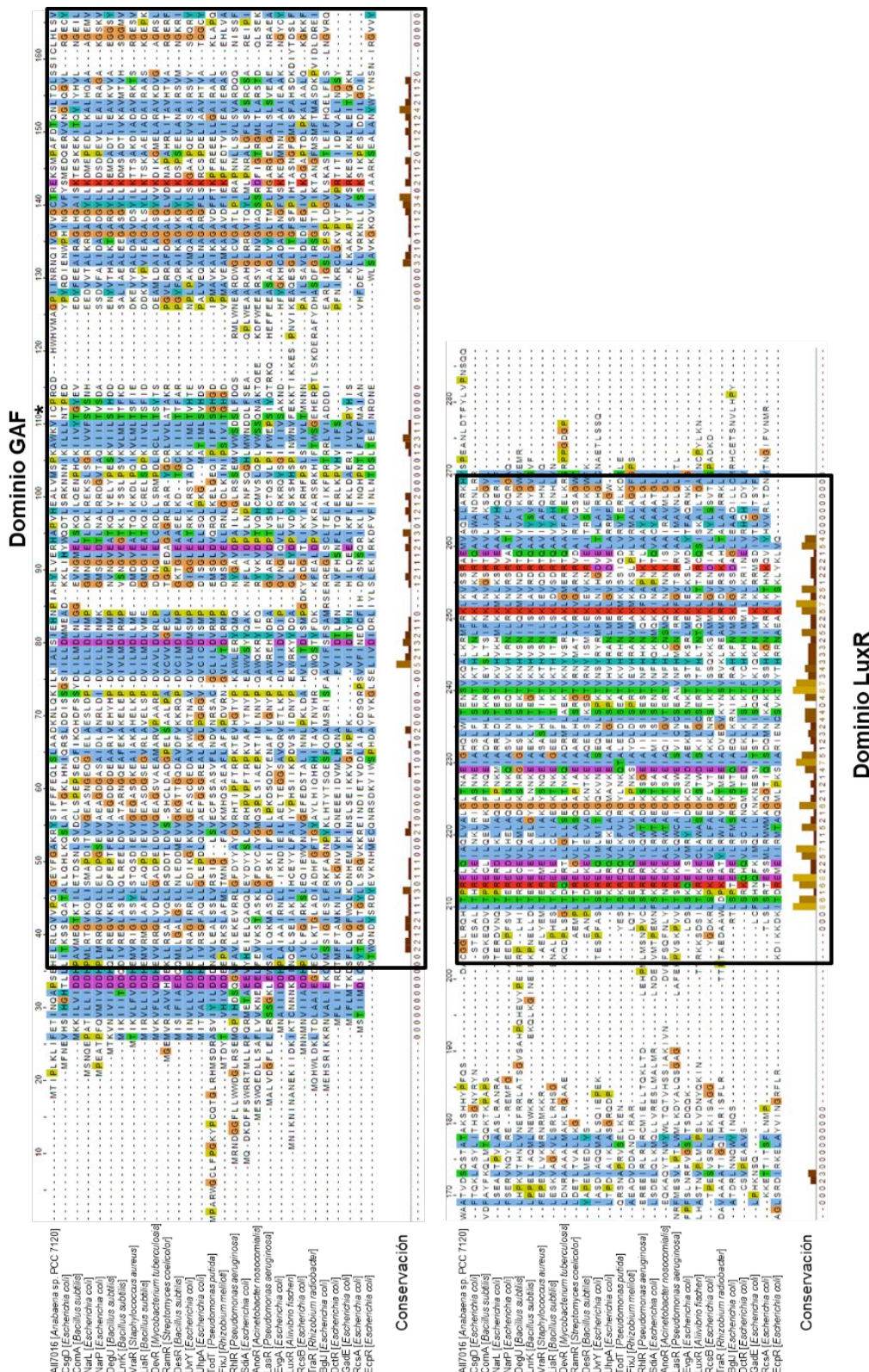


Figura S-6: Alineamiento múltiple de los homólogos al dominio LuxR de All7016 en procariotas., Imagen generada mediante JalView del alineaiento múltiple (MUSCLE) de las secuencias de aminoácidos de los homólogos de All7016. Aparecen coloreadas siguiendo un código Clustal, y se encuentran recuadrados los dominios GAF, y de unión de DNA tipo LuxR.

9.13. Purificación del regulador All7016 mediante cromatografía de afinidad a metales en KPi 50 mM pH 8

El regulador All7016 se intentó purificar mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos con Co^{2+} (IMAC- Co^{2+}) empleando como tampón base Kpi 50 mM pH 7,5 a partir de biomasa de células BL21 sobreexpresando esta proteína. Tras la purificación se analizaron todos los pasos de purificación mediante electroforesis desnaturante en geles de SDS-PAGE y se observó que la práctica totalidad la proteína quedaba en el precipitado resultante de clarificar el extracto crudo y apenas se obtenía proteína de interés en las fracciones eluidas con el gradiente de imidazol (Figura S-7).

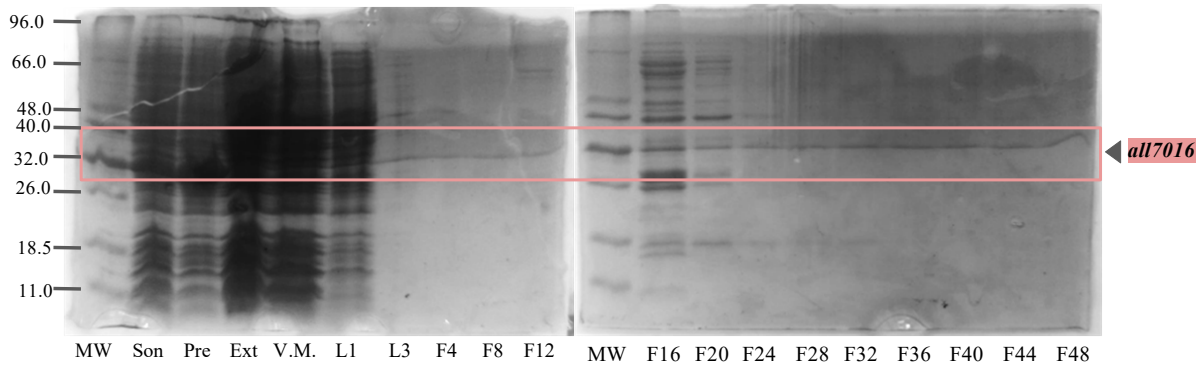


Figura S-7. Purificación del regulador All7016 con Kpi 50 mM pH 7,5. Se analizaron en geles SDS-PAGE al 17% las diferentes etapas del proceso de purificación: biomasa sonicada (Son), el precipitado (Pre) y sobrenadante (Ext) después de la clarificación, volumen muerto (Vm), lavado 1 (L1), lavado 4 (L4) y fracciones eluidas del gradiente de imidazol (F4-F48). En rojo se indica la banda que corresponde al regulador All7016. El primer carril (MW) corresponde al marcador de peso molecular Low Molecular Weigh Protein Marker II de NZYTech.