



Control redox de la percepción de metales y del metabolismo del carbono en cianobacterias

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Bioquímica por la Graduada:

Raquel M^a García Cañas

Sevilla, junio de 2021

Directores

Dr. Francisco Javier Florencio Bellido
Catedrático
de Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Luis López Maury
Profesor Titular

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), un centro mixto de la Universidad de Sevilla y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Por tanto, quiero agradecer a ambas instituciones y a su personal tanto los medios prestados para poder realizar esta tesis como haberme acogido durante la misma. También quiero agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte español (MECD) la concesión del contrato FPU (FPU15/05025) que ha permitido que pueda realizar esta tesis, así como a la financiación recibida por los diferentes proyectos concedidos al grupo del que he formado parte por el Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2016-75634-P) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PID2019-104513GB-I00).

En primer lugar tengo que agradecer profundamente a mis directores de tesis, Luis López Maury y Francisco Javier Florencio, el haberme permitido continuar mi formación investigadora mediante esta tesis doctoral y confiar en mí a lo largo de ella. Gracias Luis, por todas las horas que has invertido respondiendo a cualquier pregunta (no todas muy lógicas), animándome, aprendiendo a entender mi letra y entendiéndome hasta mejor que yo cuando escribo, enseñándome a ser crítica y enseñándome genética (aunque no sé si te alegrabas de esta parte cuando tocaba refrescar la colección). Has conseguido que diferencie entre ave y pájaro y has aprendido a traducirme mejor que nadie, incluso mis “circunstancias”. Gracias Javier por tu experiencia, tranquilidad y por todo lo que me has enseñado. Siempre has sido el primero al que preguntarle dudas de rutas metabólicas o metabolitos.

De forma general quiero agradecer a todos los integrantes del Lab 2-3 y a todos los que han pasado por aquí por cuidar de mí, animarme en cualquier situación, hacerme reír y aceptarme como soy tan rápidamente. Gracias Migue, sin ti no habría podido hacer ni la mitad de la tesis. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho tanto profesionalmente, mediante baterías de placas diferentes hechas a maldad, como personalmente animándome y apoyándome. Gracias Sandra, Maribel y M^a José por todas las veces que me habéis ayudado con un experimento, por escucharme y por motivarme para ser mejor investigadora y persona. Gracias Manuel por todo, por las charlas de ciencia, de nuestra vida y del futuro. Porque contigo se puede discutir de los fotosistemas y 5 minutos después hablar de galletas. He aprendido mucho de ti y aprecio todo el apoyo y la ayuda que me has brindado en estos años, incluso cuando me decías que había engordado en Navidad (lo cual tengo que admitir que era verdad). Gracias Pablito por tu alegría y entusiasmo, porque contigo me he dado cuenta de que pararme a echar purpurina a un puente navideño puede animarme. Gracias por siempre estar ahí para ofrecer teorías científicas o para ayudarme en lo que fuera necesario. Gracias Mai, lo único malo que puedo decir de ti es que ojalá hubieras estado más tiempo. Me he reído y he aprendido mucho contigo, aunque no sé si algún día podre olvidar la interrelación pato-pata. Muchas gracias Toñi, siempre has estado para apoyarme y animarme a superarme a mí misma, tanto en el trabajo como fuera de él. Echaré de menos ponernos juntas a calcular números para disolver compuestos. Gracias Ernesto por tu positividad, siempre preocupado por la seguridad del laboratorio.

Muchas gracias a mis compañeros de desayuno, he echado mucho de menos llegar al trabajo cada mañana y poder estar un rato con vosotros. Isa, Pablo, Ana, Diego, Laura, Fran, Nuria... Hacéis las mañanas menos mañanas. Gracias Sergio, has sido un amigo y un gran compañero. Gracias por responder a mis preguntas sobre *Anabaena*, por las charlas junto a la centrífuga y por las salidas para animarnos. Gracias a Jose Enrique por su paciencia conmigo, disculpa todas las veces que he olvidado apuntarme. Gracias Esther por enseñarme a hacer valoraciones redox, sin ti no sé cuánto tiempo habría tardado, y gracias Alicia e Isidro por ayudarnos con *Anabaena* cuando no sabíamos nada de ella. Gracias a todos mis compañeros doctorandos, aprecio muchos que siempre nos hayamos apoyado y ayudado entre nosotros. Muchas gracias a Quique y Antonio, saber que siempre que pasase por la puerta de entrada me reiría y pasaría un buen rato hacía que los días fueran mucho mejores. Echaré de menos hablar de animales y gorros cada mañana. De forma general muchas gracias a todos/as los que han formado y forman parte del cicCartuja, no podría haber hecho esta tesis sin vosotros.

Muchas gracias a mis bioquímicos y amigos. Gracias a Jose (oso polar), Aaron (mejor no pongo tu sobrenombre), Javi (romerito), Clara (shunga), Víctor, Pedro... Gracias a todos porque, aunque pase más o menos tiempo entre cada vez que estamos juntos, siempre nos hemos apoyado y animado. Por supuesto, tengo que agradecer a Bea, a pesar de la distancia siempre has estado para aconsejarme cuando era necesario. Gracias también a mi "novia" Andrea, gracias por estar siempre ahí y apoyarme en todo. Porque independientemente de que supieras más o menos sobre cianobacterias siempre me has escuchado e intentado ayudarme. Has sido una parte esencial para poder terminar esta tesis y no sabría qué anécdota escribir de las miles que tenemos juntas.

Gracias a mis padres por confiar en mí y apoyarme, por escucharme e intentar comprenderme siempre, muchas gracias por solucionar cualquier problema que pudiera tener. Aprecio enormemente todo el sacrificio que vosotros también habéis hecho para que yo llegue a este momento, la mayor verdad es que no podría haber conseguido nada de lo que he conseguido sin vosotros. Sois esenciales. Gracias Alfonso por animarme, por todas las veces que nos hemos saltado la dieta, por todos los programas que hemos visto juntos. Aunque a veces me enfade aprecio que hayas estado ahí cada día al volver a casa. Gracias a toda mi familia por confiar en mí y gracias a Anivia, Henry, Fievel y Willy por sacarme una sonrisa cada día.

Muchísimas gracias a todas las personas que de una forma u otra me han ayudado y acompañado durante estos años. Todos habéis sido esenciales para obtener esta tesis, de corazón.

Índice

Índice.....	5
Índice de tablas.....	15
Índice de figuras.....	17
Abreviaturas.....	21
Introducción.....	25
1. Las cianobacterias.....	27
2. El proceso fotosintético y respiratorio en cianobacterias.....	30
2.1. Fotosíntesis en cianobacterias.....	31
2.1.1. Los ficobilisomas (PBS) y la OCP.....	31
2.1.2. El transporte lineal de electrones (LET).....	32
2.1.3. El transporte cíclico de electrones (CET).....	33
2.2. Fijación de carbono en cianobacterias por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB).....	33
2.2.1. Sistemas de concentración de carbono.....	36
2.3. Respiración en cianobacterias.....	36
2.3.1. Oxidasas terminales respiratorias.....	37
3. Metabolismo del carbono en cianobacterias.....	37
3.1. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPP).....	39
3.2. Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glucólisis.....	40
3.3. Ruta de Entner-Doudoroff (ED).....	41
3.4. Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA).....	41
4. Regulación redox del metabolismo del carbono en cianobacterias.....	42
4.1. Regulación enzimática mediada por tiorredoxinas.....	43
4.2. Regulación enzimática mediada por glutarredoxinas.....	45
5. Las actividades FBPasa y SBPasa en organismos fotosintéticos.....	45
5.1. La actividad FBPasa en plantas.....	46
5.1.1. FBPasa citosólica.....	47
5.1.2. FBPasa cloroplastídica.....	47
5.2. La actividad SBPasa en plantas.....	48
5.3. Las actividades FBPasa y SBPasa en cianobacterias.....	49
5.3.1. La enzima FBPasa en <i>Synechocystis</i>	49
5.3.2. La enzima FBP/SBPasa en <i>Synechocystis</i>	50
6. Regulación génica en cianobacteria.....	52
6.1. Regulación transcripcional.....	52
6.2. Regulación post-transcripcional.....	54
6.2.1. Regulación por riboswitches.....	54

6.2.2. Regulación por RNAs.	54
7. Regulación por proteólisis en bacterias.....	54
7.1. Regulación por proteasas tipo M48 y reguladores transcripcionales Blal/Mecl en bacterias.	55
7.1.1. Regulación mediada por proteasas tipo M48.....	56
7.1.2. Regulación mediada por reguladores Blal/Mecl	58
8. Metabolismo de hierro y cobre, dos metales esenciales para la fotosíntesis en cianobacterias.....	59
8.1. Metabolismo y homeostasis del hierro.....	59
8.2. Metabolismo y homeostasis del cobre.....	61
Materiales y Métodos.....	65
1. Organismos y condiciones de cultivo	67
1.1. Cianobacterias.....	67
1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.....	67
1.1.2. Medios y condiciones de cultivo.....	69
1.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	70
1.2.1 Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas.....	70
1.2.2. Medios y condiciones de cultivo.....	71
1.3. Métodos de recogida de células.....	71
2. Métodos de biología molecular.....	72
2.1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	72
2.1.1. Oligonucleótidos.....	72
2.1.2. Plásmidos	75
2.2. Aislamiento y manipulación del DNA	81
2.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	81
2.2.2. Aislamiento de DNA genómico de cianobacterias.....	82
2.3. Introducción de DNA exógeno en organismos.....	82
2.3.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	82
2.3.1.1. Transformación por choque térmico.....	82
2.3.1.2. Transformación por electroporación.....	83
2.3.1.3. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	83
2.3.2. Transformación de células de <i>Synechocystis</i>	83
2.3.3. Transferencia de DNA a <i>Anabaena</i> por conjugación triparental.	84
2.4. Análisis y cuantificación del DNA.....	85
2.4.1. Cuantificación de la concentración de DNA.....	85
2.4.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	85
2.4.3. Extracción de DNA de geles de agarosa.....	85

2.4.4. Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	85
2.4.4.1. Generación de mutantes dirigidos mediante PCR.	86
2.4.5. Manipulación enzimática del DNA.	87
2.4.6. Secuenciación del DNA.	87
2.4.7. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) de fragmentos de DNA.	87
2.4.8. Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA.	88
2.5. Análisis y cuantificación del RNA.	88
2.5.1. Tratamiento del material.	88
2.5.2. Aislamiento de RNA total de <i>Synechocystis</i>	88
2.5.3. Cuantificación del RNA aislado.	89
2.5.4. Electroforesis de RNA.	89
2.5.5. Detección del RNA _m mediante hibridación RNA-DNA (Northern blot).	89
2.5.7. Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq).	90
3. Métodos bioquímicos.	90
3.1. Preparación de extractos celulares.	90
3.1.1. Rotura con perlas de vidrio.	90
3.1.2. Rotura por ultrasonidos.	91
3.1.3. Preparación de muestras con células enteras	91
3.2. Cuantificación de proteínas.	91
3.3. Electroforesis de proteínas	91
3.3.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.	91
3.3.2. Tinción con Coomasie.	92
3.4. Inmunodetección de proteínas en membrana (Western Blot).	92
3.5. Purificación de proteínas.	93
3.5.1. Cromatografía de afinidad por níquel.	93
3.5.2. Cromatografía de exclusión molecular.	94
3.6. Oxidación o reducción de proteínas purificadas.	94
3.7. Concentración de proteínas por ultrafiltración.	95
3.8. Alquilación de proteínas.	95
4. Métodos biofísicos.	96
4.1. Evolución de oxígeno mediante el electrodo de Clark.	96
5. Ensayos enzimáticos.	96
5.1. Determinación de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.	96

5.1.1. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	96
5.1.2. Determinación <i>in situ</i> de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	96
5.2. Determinación enzimática de glucógeno y glucosa extracelular	97
5.3. Medida de la actividad proteasa de PetP	97
6. Métodos bioinformáticos.	98
6.1. Obtención de las secuencias y análisis básico	98
7. Otros métodos analíticos.....	99
7.1. Determinación de la concentración de clorofila.....	99
7.2. Medidas espectrofotométricas.	99
7.3. Medidas de pH.....	99
Resultados.....	101
A. Regulación del intercambio citocromo c_6 /plastocianina mediada por proteasa	103
1. Análisis de la co-presencia con otros genes de <i>petE</i> y <i>petJ</i>	105
2. Análisis funcional de los genes <i>petR</i> y <i>PetP</i> en <i>Synechocystis</i>	107
2.1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína PetR y su efecto en la regulación mediada por cobre.....	107
2.1.1. Cambios en los niveles de Cit c_6 , Pc y PetR en distintas concentraciones de cobre.....	109
2.1.2. Generación de la estirpe PETR.	110
2.1.3. Caracterización del intercambio citocromo c_6 /plastocianina en el mutante PETR.....	111
2.2. Análisis <i>in silico</i> de la proteína PetP y su papel en la regulación mediada por cobre.....	112
2.2.1. Generación de la estirpe PETS.....	114
2.2.2. Caracterización del intercambio citocromo c_6 /plastocianina en el mutante PETS.....	115
2.3. Efectos de la mutación del operón <i>slr0240-41</i> en la regulación mediada por cobre.....	116
2.4. Cuantificación de los niveles de Pc, Cit c_6 y PetR en relación a la disponibilidad de cobre.	117
2.5. Identificación de los genes regulados mediante el sistema <i>petRP</i> /PetRP.....	120
2.5.1. Efectos de la alteración de PetR y PetP en el transcriptoma.	120
2.5.2. Análisis de la capacidad reguladora de PetR sobre distintos promotores.	122
3. Estudio del gen <i>slr0601</i> regulado por PetR.....	124
3.1. Estudio fisiológico del mutante SLR0601.....	126
4. Caracterización de la actividad proteasa de PetP sobre PetR.	127

4.1. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad proteasa de PetP.	127
4.2. Determinación de residuos implicados en la actividad proteasa.	128
4.2.1. Generación de mutantes PETP con residuos alterados.....	128
4.2.2. Análisis fenotípico del mutante PETRP complementado.	129
4.2.3. Análisis fenotípico de los mutantes puntuales de PetP.....	130
4.2.3.1. Análisis fenotípico del mutante PETRP+HAAA.	131
4.2.3.2. Análisis fenotípico de los mutantes puntuales de las metioninas M53 y M58.	133
5. Estudio de la interacción genética entre <i>petJ</i> , <i>petE</i> , <i>petR</i> y <i>petP</i>	136
5.1. Estudio de los cambios fisiológicos de los mutantes PETJ y PETE.	137
6. Estudio a nivel fisiológicos del efecto de la presencia o ausencia de cobre en mutantes del sistema PetRP.	139
6.1. Efectos sobre el crecimiento.	139
6.2. Efectos sobre la fotosíntesis.	140
7. Análisis del sistema <i>petRP</i> en la cianobacteria filamentosa <i>Anabaena</i>	142
6.1. Generación de los mutantes PETP y PETR.....	143
6.2. Caracterización de los mutantes en el sistema <i>petRP</i> de <i>Anabaena</i>	144
B. Estudio funcional y caracterización de las FBPasas de <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	147
1. Análisis fenotípico y fisiológico de los mutantes de la FBPasa y FBP/SBPasa en <i>Synechocystis</i>	149
1.1. Determinación de los niveles de ambas proteínas ante distintas condiciones de crecimiento.	149
1.2. Estudio de los mutantes ΔF y $\Delta F/S$	150
1.2.2. Determinación del consumo de carbono.	152
1.2.3. Determinación de las tasas fotosintética y respiratorio de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF	154
2. Análisis de la regulación redox de la FBP/SBPasa y la FBPasa.	157
2.1. Regulación <i>in vitro</i> en la actividad FBPasa por tiorredoxina en <i>Synechocystis</i>	158
2.2. Determinación de las cisteínas implicadas en la regulación de la FBP/SBPasa.	163
2.2.1. Aproximación bioinformática de las cisteínas esenciales.	163
2.2.2. Generación y purificación de las proteínas C99S, C77SC84S, C75SC99S y C84SC99S.	164
2.2.3. Regulación redox de la actividad FBPasa de los mutantes C75S, C84S, C99S, C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S.	165
2.2.4. Cambios conformacionales de las proteínas C75S, C84S, C99S, C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S.	168

2.2.5. Efectos de la sobreexpresión de las variantes C75SC85S y C99S de la FBP/SBPasa.....	171
2.2.5.1. Generación de las estirpes sobreexpresoras de C75SC85S y C99S en <i>Synechocystis</i>	172
2.2.5.2. Análisis fisiológico de las estirpes C75SC85S y C99S.	173
2.3. Regulación redox de la FBP/SBPasa y la FBPasa <i>in vivo</i>	175
2.3.1. Regulación dependiente de luz.....	177
2.3.2. Regulación dependiente de las condiciones tróficas.....	178
3. Determinación de la esencialidad de las actividades SBPasa y FBPasa para el crecimiento fotoautotrófico.	180
3.1. Análisis de la complementación con la SBPasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	184
3.2. Análisis de la complementación con la FBPasa cloroplastídica de <i>Pisum sativum</i>	186
3.2.1. Complementación de la estirpe $\Delta F/S$ por la expresión de una FBPasa cloroplastídica.....	186
3.3. Análisis de la expresión conjunta de la FBPasa y SBPasa de planta.	188
3.3.1. Recuperación del crecimiento fotoautotrófico del mutante $\Delta F/S$	188
3.3.2. Efecto de la sobreexpresión de las enzimas de plantas en fotoautotrofia.	190
3.3.3. Cambios en la actividad FBPasa de las estirpes.	192
3.4. Cambios en la eficiencia de las proteínas cloroplastídicas por la presencia de la tiorredoxina <i>f1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	194
3.4.1. Generación de la estirpe sobreexpresora de Trx <i>f1</i>	194
3.4.2. Efectos en el crecimiento y en la capacidad fotosintética.	196
3.4.3. Efectos redox en las proteínas cloroplastídicas.	199
Discusión	203
I. Regulación del intercambio Citocromo c_6 – Plastocianina.....	205
1. Control de la expresión <i>petJ/petE</i> mediado por PetR/PetP.....	205
1.1. Características de la regulación mediada por PetR.	208
1.2. Características de la regulación mediada por PetP.	211
2. Implicaciones de la regulación y desregulación del sistema <i>petJ/petE</i> . ..	213
II. Regulación del ciclo del carbono mediada por las actividades FBPasa y SBPasa.	216
1. Importancia de la FBPasa y la FBP/SBPasa en <i>Synechocystis</i>	218
1.1. Importancia de la FBP/SBPasa en el metabolismo.....	218
1.2. Importancia de la FBPasa en el metabolismo.....	220
1.3. Importancia de la regulación de las FBPasas.	221

1.3.1. Regulación específica de la FBP/SBPasa.	224
2. Esencialidad de las actividades FBPasa y SBPasa en <i>Synechocystis</i> . .	226
2.1. Implicación de ambas actividades en fotoautotrofia y el catabolismo del carbono.	226
2.2. Diferencias en la regulación redox en <i>Synechocystis</i> y plantas.	229
Conclusiones	233
Bibliografía.....	237

Índice de tablas

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.....	67
Tabla 2. Composición del medio BG11	69
Tabla 3. Concentraciones de antibióticos empleadas en las estirpes de cianobacterias.	69
Tabla 4. Estirpes de E. coli empleadas en este trabajo.	70
Tabla 5. Composición del medio LB.	71
Tabla 6. Compuestos empleados en las estirpes de E. coli.....	71
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	72
Tabla 8. Plásmidos no construidos en este trabajo y su descripción.	75
Tabla 9. Plásmidos construidos en este trabajo y su descripción.	77
Tabla 10. Genes alterados mediante PCR solapante.	86
Tabla 11. Sondas usadas en la detección mediante marcaje radioactivo.....	90
Tabla 12. Anticuerpos primarios, dilución de los mismos empleada y peso molecular de sus dianas	93
Tabla 13. Proteínas purificadas en este trabajo desde BL21.....	94
Tabla 14. Proteínas utilizadas que no han sido purificadas.	94

Índice de figuras

Figura 1. Estirpes de cianobacterias empleadas en este trabajo.	28
Figura 2. Cadena de transporte electrónico fotosintético en <i>Synechocystis</i>	30
Figura 3. Cadena de transporte electrónico respiratorio en <i>Synechocystis</i>	31
Figura 4. Ciclo de Calvin-Benson-Bassham en cianobacterias.	35
Figura 5. Esquema de las rutas de asimilación del carbono en <i>Synechocystis</i>	38
Figura 6. Mecanismos de reacción con proteínas de las tiorredoxinas y glutarredoxinas de cianobacterias.	44
Figura 7. Regulación de la regulación de las FBPasa de plantas.	46
Figura 8. Regulación de la enzima SBPasa de plantas.	49
Figura 9. Regulación y estructura de las enzimas FBPasa y FBP/SBPasa de <i>Synechocystis</i>	51
Figura 10. Esquema de la regulación por las proteasas BlaR1 y MecR1 (tipo M48) sobre los reguladores transcripcionales Blal y Mecl.	56
Figura 11. Distribución en las cianobacterias de los genes que codifican para petR, PetP, petJ y petE.	106
Figura 12. Características principales de PetR determinadas mediante análisis bioinformático.	108
Figura 13. Acumulación en PetR, PetJ y PetE de forma dependiente de cobre. .	109
Figura 14. Generación y comprobación del mutante PETR.	110
Figura 15. Análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y el citocromo c ₆ en respuesta en el mutante PETR.	111
Figura 16. Características principales de PetP determinadas mediante análisis bioinformático.	113
Figura 17. Generación y comprobación del mutante PETP.	114
Figura 18. Análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y el citocromo c ₆ en respuesta en el mutante PETP.	115
Figura 19. Construcción del mutante PETERP y análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y el citocromo c ₆ en respuesta a cobre en él. ...	116
Figura 20. Cuantificación de PetJ, PetE y PetR en las estirpes WT, PETR y PETP en distintas disponibilidades de cobre.	119
Figura 21. Análisis por RNA-seq de la regulación que depende de PetR-PetP. ...	121
Figura 22. Análisis de la unión de PetR a los promotores de petJ y petE.	123
Figura 23. Análisis de los sitios de unión de PetR con los promotores de petJ y petE.	124
Figura 24. Análisis de la unión de PetR al promotor de slr0601.	125
Figura 25. Construcción, comprobación y fenotipo de la estirpe SLR0601.	126
Figura 26. Determinación de la actividad proteasa de PetP sobre PetR de forma dependiente de cobre.	128
Figura 27. Construcción de las estirpes PETERP+RP, PETERP+HAHA, PETERP+M53A, PETERP+M58A y PETERP+M53AM58A.	129
Figura 28. Comprobación de la recuperación del fenotipo WT en la estirpe PETERP+RP.	130
Figura 29. Comparación del crecimiento de las estirpes WT, PETERP, PETERP+RP, PETERP+HAHA, PETERP+M53A, PETERP+M58A y PETERP+M53AM58A ante diferente disponibilidad de cobre.	131

Figura 30. Determinación del efecto de la sustitución de las histidinas H150 y H154 en PetP en el intercambio PetJ/petE y su actividad proteasa sobre PetR.	132
Figura 31. Determinación del efecto de la sustitución de las metioninas M53 y/o M58 en la percepción de cobre de PetP.....	134
Figura 32. Determinación de los cambios en la respuesta proteica a cobre debido a la alteración de las metioninas M53 y/o M58.	135
Figura 34. Comprobación de la segregación de las estirpes PETJ, PETE, PETEJ, PETER, PETEP, PETERP, PETJR, PETJP y PETJRP.	137
Figura 34. Análisis del crecimiento de las estirpes PETE, PETJ, PETEP, PETJR y PETJRP ante diferente disponibilidad de cobre.....	138
Figura 36. Análisis del crecimiento y la capacidad fotosintética de distintas condiciones de disponibilidad de cobre para las estirpes PETER, PETP, PETJ, PETE, PETEP y PETJR.....	141
Figura 36. Estructura tridimensional de PetP en Anabaena y contexto genético de los genes que codifican para PetR, PetP, plastocianina y los citocromos c_6	143
Figura 37. Construcción de las estirpes PETER_An y PETP_An.....	144
Figura 38. Análisis del sistema de regulación PetR-PetP y su control en el intercambio petJ/petE ante cobre en Anabaena.	145
Figura 39. Regulación de la cantidad de FBP/SBPasa y FBPasa dependiente de las condiciones de luz y carbono.	150
Figura 41. Crecimiento de los mutantes ΔF y $\Delta F/S$ en diferentes condiciones de disponibilidad de carbono y luz.....	151
Figura 41. Consumo de glucosa extracelular y glucógeno de las estirpes WT ΔF y $\Delta F/S$ en mixotrofia y fotoautotrofia.	154
Figura 42. Desprendimiento de oxígeno ante diferentes condiciones de disponibilidad de carbono de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF	156
Figura 43. Consumo de oxígeno de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF e mixotrofia y fotoheterotrofia..	157
Figura 44. Medida in situ de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa.	158
Figura 45. Regulación redox in vitro de la actividad de la FBP/SBPasa y FBPasa de Synechocystis.....	159
Figura 46. Regulación de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de las enzimas FBP/SBPasa y FBPasa de Synechocystis mediada por tioredoxina.	161
Figura 47. Análisis bioinformático de la conservación de cisteínas en la FBP/SBPasa.....	164
Figura 48. Purificación de las proteínas con las cisteínas 75, 84 y/o 99 alterados a serina y regulación redox de las proteínas FBP/SBPasa C75S, C84S y C99S. ...	166
Figura 49. Las proteínas C75SC99S y C84SC99S, a diferencia de C75SC84S, no son susceptibles de regulación redox.	167
Figura 50. Cambios conformacionales en la proteína FBP/SBPasa y sus variantes con una cisteína alterada ante la oxidación-reducción..	169
Figura 51. Cambios conformacionales en las proteínas FBP/SBPasa con dos de sus cisteínas alteradas ante la oxidación-reducción..	171
Figura 52. Construcción de las estirpes C99S y C75SC84S de Synechocystis... ..	172
Figura 53. Análisis del fenotipo de los mutantes sobreexpresores de la FBP/SBPasa C75SC84S y C99S.	174
Figura 54. Ensayos de alquilación de las proteínas FBP/SBPasa y FBPasa tras su reducción/oxidación.....	176

Figura 55. Análisis de los cambios en el estado redox de las proteínas FBPasa y FBP/SBPasa dependientes de luz.....	177
Figura 56. Análisis de los cambios en el estado redox de las proteínas FBP/SBPasa y FBPasa en autotrofia, mixotrofia y heterotrofia. (.....	179
Figura 57. Construcción de las estirpes sobreexpresoras de la SBPasaAt.	181
Figura 58. Construcción de las estirpes que expresaban la FBPasaPs.....	182
Figura 59. Comprobación de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF	183
Figura 60. Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia de las estirpes sobreexpresoras de la SBPasaAt.	185
Figura 61. Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia de las estirpes sobreexpresoras de la FBPasaPs. ...	187
Figura 62 Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia de las estirpes sobreexpresoras de la FBPasaPs y SBPasaAt.....	189
Figura 63. Crecimiento de los mutantes S y $\Delta F+S$ ante diferentes intensidades luminosas.	190
Figura 64. Crecimiento del mutantes F ante diferentes intensidades luminosas.	191
Figura 65. Medida de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en mutantes que expresan SBPasaAt y FBPasaPs.....	193
Figura 66. Construcción de las estirpes que expresaban la tiorredoxina f1 de <i>A. thaliana</i>	195
Figura 67. Crecimiento a diferentes intensidades luminosas de la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$	196
Figura 68. Análisis de la actividad FBPasa y de la evolución de oxígeno de la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ dependiendo de la intensidad luminosa.....	198
Figura 69. Análisis del estado redox de la FBPasa cloroplastídica dependiente de luz de la presencia de TrxF1.	200
Figura 70. Análisis de la reducción de TrxF1 en la estirpe $\Delta S/F+S+F+TrxF$ dependiente de la intensidad luminosa.....	202
Figura 71. Análisis de la expresión de petRP en respuesta a cobre.	206
Figura 72. Análisis de la degradación de PetR en los mutantes PETR2 y PETR3.	207
Figura 73. Esquema del mecanismo de regulación PetR/PetP.....	209
Figura 74. Niveles de isaR1 en los mutantes PETR y PETP.	214
Figura 75. Análisis de la ausencia de la FBPasa FBP/SBPasa en las cianobacterias..	217
Figura 76. Regulación por luz de las FBPasas de <i>Synechocystis</i> ..	223
Figura 77. Resumen de las características de las diferentes enzimas con actividad FBPasa en <i>Synechocystis</i>	229

Abreviaturas

1,3-BPG	1,3-bisfosfoglicerato
2-OGDC	2-oxoglutarato descarboxilasa
2-PG	2-fosfoglicerato
3-PG	3-fosfoglicerato
ACO	Aconitasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina monofosfato
Ala (A)	Alanina
AMP	Adenosina difosfato
AMS	Ácido 4-acetamido-4'-maleidimilestilbeno-2,2'-disulfónico
Ap	Ampicilina
Arg (R)	Arginina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _{NC}	RNA no codificante
RNA _m	RNA mensajero
RNA _s	RNA pequeño
Asn (N)	Asparragina
Asp (D)	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
BCSA	Ácido batocuproinedisulfónico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
Chl	Clorofila
Cm	Cloranfenicol
CoA	Coenzima A
CBB	Ciclo de Calvin-Benson-Bassham
CET	Transporte cíclico de electrones
Ciclo TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
Cit b _{6f}	Citocromo b _{6f}
Cit c ₆	Citocromo c ₆
CS	Citrato sintasa
COX	Citocromo c oxidasa
Cyd	Quinol oxidasa bd
Cys (C)	Cisteína
Da	Dalton
DCMU	3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilurea
DDOR	Flavin disulfuro oxidoreductasa
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
DO	Densidad óptica
E	Einstein
e ⁻	Electrón
E-4-P	Eritrosa-4-fosfato

ED	Entner-Doudoroff
EDA	KDPG aldolasa
EDD	6-fosfogluconato deshidratasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMP	Embden-Meyerhof-PRNAas
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
Eno	Enolasa
F-1,6-BP	Fructosa 1,6-bisfosfato
F-6-P	Fructosa-6-fosfato
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
FBP/SBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa/Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
Fd	Feredoxina
Fe	Hierro
FFTR	Ferredoxina flavin-tiorredoxina reductasa
FNR	Ferredoxina:NADP ⁺ reductasa
FTR	Ferredoxina-tiorredoxina reductasa
FUM	Fumarasa
g	Gramo
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
G-3-P	Gliceraldehído 3-fosfato
GADPH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GK	Gluconato quinasa
Gly (G)	Glicina
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GND	6-fosfogluconato deshidrogenasa
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Glutamato
GR	Glutación reductasa
GRX	Glutarredoxinas
GSI	Glutamina sintetasa tipo I
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Glutación S-transferasa
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
His (H)	Histidina
HK	Hexoquinasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
Ile (I)	Isoleucina
Kb	Kilobase
KDPG	2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato
Km	Kanamicina
l	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
LET	Transporte lineal de electrones
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
m	Metro
M	Molar
MDH	Malato deshidrogenasa

Met (M)	Metionina
Mg	Magnesio
min	Minuto
MM(PEG24)	Metil-PEG-Maleimida
Mn	Manganeso
N	Normal
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado / reducido
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido-fosfato oxidado / reducido
NDH-1	NAD(P)H deshidrogenasa tipo I
NDH-2	NAD(P)H deshidrogenasa tipo II
NEM	N-etilmaleimida
NTR	NAD(P)H tiorredoxina reductasa
NTRC	Tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH tipo C
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OCP	Proteína carotenoide naranja
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
OPP	Ruta oxidativa de las pentosas
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen
PBP	Ficobiliproteínas
PBS	Ficobilisomas
PC	Plastocianina
PCC	Colección de cultivos del Instituto Pasteur
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofructoquinasa
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGK	Fosfoglicerato quinasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
Phe (P)	Fenilalanina
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo poly (dl-dC) Ácido poli(desoxiinosínico- desoxicitídílico)
PQ	Plastoquinonina
PRK	Fosforibuloquinasa
Pro (P)	Prolina
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
R5P	Ribosa-5-fosfato
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Ribulosa-5-fosfato epimerasa
RPI	Ribulosa-5-fosfato isomerasa
rpm	Revoluciones por minuto
Ru-1,5-BP	Ribulosa-1,5-bisfosfato

Ru-5-P	Ribulosa-1-fosfato
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa
s	Segundos
S-1,7-BP	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato
S-7-P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser (S)	Serina
Sp	Espectinomycinina
sp.	Especie
SSADH	Succinil semialdehido deshidrogenasa
SSPE	Tampón compuesto por una mezcla de NaCl, fosfato de sodio y EDTA
St	Estreptomycinina
TA	Transaldolasa
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamida
Thr (T)	Treonina
TK	Transcetolasa
TPI	Triosa fosfato isomerasa
TR	Tiorredoxina reductasa
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp (W)	Triptófano
Trx	Tiorredoxina
Tyr (Y)	Tirosina
U	Unidad de actividad enzimática
UTR	Región no traducida del gen (<i>untranslated region</i>)
v/v	Relación volumen/volumen
Val	Valina
WT	Estirpe silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Xu-5-P	Xilulosa-5-fosfato

Introducción

1. Las cianobacterias.

Las cianobacterias son el mayor y más diverso grupo de organismos procariontes fotosintéticos. Estas eubacterias se caracterizan por poseer pigmentos fotosintéticos y ser capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica de forma similar a la que realizan algas y plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Woese, 1987). De hecho, las cianobacterias se consideran los ancestros de los cloroplastos que permiten actualmente que las algas y las plantas superiores realicen la fotosíntesis (Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005; Reyes-Prieto y Bhattacharya, 2007; Archibald, 2009; Yagi y Shiina, 2014). Actualmente se cree que una célula eucariota primitiva, hace aproximadamente 1500 millones de años, endocitó una cianobacteria generándose así uno de los primeros procesos de endosimbiosis. Esto originó tres linajes de cloroplastos en glaucocitas, clorofitas y rodofitas. De forma que las cianobacterias cumplen una función importante en el ciclo del carbono (Yoon et al., 2004; Reyes-Prieto y Bhattacharya, 2007). Las cianobacterias constituyen el grupo de organismos fotosintéticos más abundante del planeta; estos organismos están distribuidos en un amplio número de ecosistemas, pudiéndose encontrar cianobacterias en ambientes muy diferentes que van desde desiertos hasta zonas polares (Whitton y Malcolm, 2000), aunque suelen encontrarse principalmente en los mares y océanos. Son organismos ancestrales y se ha demostrado la existencia de microorganismos fotosintéticos en fósiles con más de 2500 millones de años. Fue gracias a la aparición de la fotosíntesis oxigénica en estos organismos que se produjo el paso de una atmósfera reductora a una oxidante. De esta forma la liberación masiva de O₂ a la atmósfera y la acumulación de este permitió el desarrollo de la capa de ozono que protege de la radiación ultravioleta al planeta, protegiendo así a los organismos que posteriormente habitarían la Tierra (Schopf, 1993, 2011; López-García et al., 2006; Alcott et al., 2019). Este evento dio como resultado la evolución a organismos aeróbicos, y por tanto a la existencia de las formas de vida actuales (Blankenship, 1992). Sin embargo, también generó cambios a los que tuvieron que adaptarse las formas de vida existentes. Uno de los cambios de gran importancia fue la disminución de la biodisponibilidad de hierro. Esto se debe a que el hierro oxidado (Fe³⁺) presenta una menor disponibilidad, ya que precipita, que el hierro reducido (Fe²⁺) (Ochiai, 1983; Crichton y Pierre, 2001)..

Existen cianobacterias que, además de fijar CO₂, son capaces de realizar la fijación de dinitrógeno, contribuyendo así en el ciclo del nitrógeno además del ciclo del carbono y del oxígeno (Li, 1994; Montoya et al., 2004). Por tanto, las cianobacterias son organismos de gran importancia dentro de los ecosistemas donde habitan. De hecho, las cianobacterias oceánicas contribuyen con 2/3 de la producción primaria de los mismo, lo que a su vez es la mitad de la producción global (García-Fernández et al., 2004). Por tanto, la incorporación de carbono en los compuestos orgánicos mediada por cianobacterias constituye una de las principales fuentes de ingreso de este a los seres vivos. Las cianobacterias, tanto unicelulares como filamentosas, que cuentan con el complejo de la nitrogenasa incorporan el N₂ atmosférico en compuestos orgánicos (Esteves-Ferreira et al., 2017), permitiendo así la interrelación cianobacteria-ciclo del nitrógeno. Puesto que intervienen tanto en la fijación de carbono como de nitrógeno, hay cianobacterias endosimbiontes de otros organismos como plantas u hongos que les proporcionan a los mismos el nitrógeno

o el carbono fijado (Reisser, 1984). Además, una de las principales características de las cianobacterias es su gran plásticidad metabólica, ya que son capaces de vivir fotoautotroficamente, mixotróficamente y fotoheterotróficamente (Rippka, 1972).

Las cianobacterias se clasifican como bacterias Gram (-), pues presentan una membrana plasmática rodeada por una envuelta de peptidoglicanos que a su vez está rodeada por una membrana externa selectivamente permeable (Woese, 1987). Pero a diferencia de otras bacterias Gram (-) las cianobacterias presentan en su interior un sistema de endomembranas denominadas tilacoides. En los tilacoides se produce el transporte electrónico durante la fotosíntesis y la respiración. La organización de dichas membranas difiere de las presentes en los cloroplastos, pues las membranas tilacoidales se agrupan formando capas y no en forma de grana (Liberton et al., 2006; Casella et al., 2017; Mareš et al., 2019). Es en los tilacoides donde se ubican los fotosistemas, que contienen los centros de reacción fotosintéticos con los pigmentos fotosintéticos: clorofilas y carotenos. Otras características de las cianobacterias son la presencia de carboxisomas icosaédricos (donde se fija el CO₂), los ficobilisomas (encargados de captar la luz) y gránulos de almacenamiento diversos como los gránulos de glucógeno, cianoficinas o PHB (Kerfeld et al., 2010). De forma tradicional las cianobacterias se han clasificado atendiendo a sus características morfológicas, así como a su tipo de división celular, en cinco secciones morfológicas (Rippka et al., 1979).

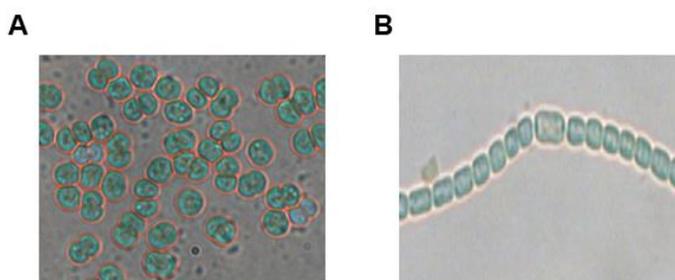


Figura 1. Estirpes de cianobacterias empleadas en este trabajo. (A) Imagen a microscopio de *Synechocystis* sp. PCC 6803, representativa de la sección I de la clasificación de (Rippka et al., 1979). La imagen pertenece a la colección del laboratorio. **(B)** Imagen a microscopio de *Anabaena* sp. PCC 7120, representativa de la sección IV de la clasificación de (Rippka et al., 1979). La imagen ha sido cedida por el laboratorio de Enrique Flores.

La sección I la forman organismos unicelulares que se dividen por fisión binaria o por gemación como puede ser *Synechocystis*. La sección II incluye estirpes unicelulares que se dividen por fisión múltiple y/o fisión binaria como es el género *Pleurocapsa*. La sección III la componen estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos (células diferenciadas especializadas en la fijación de nitrógeno) como son las pertenecientes al género *Pseudoanabaena*. En las secciones IV y V están incluidas estirpes filamentosas que forman heterocistos y que además son capaces de generar akinetos (estructuras de resistencia) en situaciones de estrés y hormogonios (estructuras de dispersión). Si la división es en un solo plano pertenecerán a la sección IV, como es el caso de *Anabaena*, si es en múltiples planos pertenecerán a la sección V como *Fischerella*. Sin embargo aunque este sistema se siga utilizando las clasificaciones más recientes se basan en métodos de filogenia molecular, ya que estos demuestran que la clasificación morfológica no es fiel a la relación real entre las estirpes y solo las secciones IV y V son filogenéticamente coherentes (Giovannoni et al., 1988; Sánchez-Baracaldo et al., 2005; Tomitani et al., 2006; Shih et al., 2013). De forma que en base a estos análisis

se cree que algunas estirpes unicelulares han aparecido como el resultado de la pérdida de la capacidad de formar filamentos de estirpes anteriores, por lo que el hecho de que formen filamentos no significa que sean estirpes más recientes (Shih et al., 2013).

Desde 1996 se han secuenciado un gran número de genomas de cianobacterias, siendo el primero el de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko et al., 1996). El contenido G+C de estos organismos oscila entre 32% y 71%. De forma general todas estas bacterias son especies poliploides y contienen un número variable de copias cromosómicas por célula (Labarre et al., 1989). Algunas cianobacterias, como aquellas del género *Synechocystis*, son capaces de incorporar DNA exógeno en su genoma mediante transformación y recombinación homóloga (Porter, 1986). En aquellas que no poseen esta capacidad y por tanto son no transformables se han desarrollado métodos como la conjugación (Wolk et al., 1984; Flores y Wolk, 1985) o la electroporación (Thiel y Poo, 1989). Todo esto y el hecho de que presenten una menor complejidad y se requiere un menor tiempo para conseguir una cantidad significativa de biomasa respecto a las plantas superiores, hace que muchas cianobacterias sean modelos adecuados para estudiar la fijación de carbono, nitrógeno o la fotosíntesis. En este trabajo se han empleado las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Nostoc* sp. PCC 7120).

Synechocystis sp. PCC 6803, en adelante *Synechocystis*, es una especie unicelular, no tóxica y no fijadora de nitrógeno (Figura 1) que pertenece a la sección taxonómica I (Rippka et al., 1979). Es una especie poliploide con un genoma compuesto por un cromosoma circular de aproximadamente 3,57 Mb y 7 plásmidos de tamaños entre 119 y 2,2 Kb. (Chauvat et al., 1986; Kaneko et al., 1996; Berla y Pakrasi, 2012). Su genoma tiene un contenido G+C de un 47% y puede presentar hasta 12 copias de su genoma por célula (Labarre et al., 1989; Griese et al., 2011). Morfológicamente las células de *Synechocystis* son esferas imperfectas con un tamaño de 1,5 µm de diámetro (Van de Meene et al., 2006). Esta cianobacteria es capaz de crecer en distintas condiciones (fotoautotrófica, mixotrófica y heterotrófica), presenta recombinación homóloga, es fácilmente transformable y tiene un tiempo de duplicación relativamente corto (cada 8 horas). Todo esto hace que sea un organismo modelo adecuado para estudiar tanto la fotosíntesis como el metabolismo del carbono y del nitrógeno.

Anabaena sp PCC 7120, en adelante *Anabaena*, es una estirpe filamentosa que, en deficiencia de nitrógeno combinado, es capaz de diferenciar sus células hacia la generación de heterocistos y fijar dinitrógeno en los mismos (Muro-Pastor y Hess, 2012). Los heterocistos, por tanto, son células diferenciadas donde se produce la expresión de la enzima nitrogenasa, encargada de la fijación de dinitrógeno. Además, debido a la inactivación de este proceso por oxígeno, en estas células no se realiza la fotosíntesis (Flores y Herrero, 2010). El genoma de este organismo consta de 7,2 Mb, donde 6,4 Mb corresponden al cromosoma circular y el resto a 6 plásmidos de entre 5,5 y 408 Kb. El contenido G+C del mismo corresponde a un 41% (Kaneko et al., 2001). Solo el 37% de los genes de esta cianobacteria son similares a los presentes en *Synechocystis*, de forma que existe una gran divergencia entre ambas.

2. El proceso fotosintético y respiratorio en cianobacterias

Las cianobacterias, algas y plantas son los únicos organismos capaces de convertir la energía luminosa del sol en energía química mediante la fotosíntesis oxigénica. Esto va a permitir la fijación de carbono inorgánico en forma de carbono orgánico, generando por tanto el ciclo del carbono. Este proceso agrupa una serie de reacciones en forma de transporte electrónico a través de diferentes complejos que emplean la energía luminosa para generar ATP y NADPH. Siendo estas moléculas las que proveerán el poder reductor y la energía necesaria para realizar la fijación de CO₂ y generar así moléculas de azúcares. Este conjunto de reacciones lumínicas tendrá lugar en un sistema interno de membranas denominado tilacoide

Una de las principales características de la membrana tilacoidal de las cianobacterias es que en estas se encuentran tanto los elementos de la cadena de transporte electrónico fotosintético como los pertenecientes al transporte electrónico respiratorio (Liu, 2016). Los grandes complejos relacionados con el proceso fotosintético en la membrana incluyen: los ficobilisomas (pigmentos antena), el fotosistema II (PSII), el fotosistema I (PSI), el citocromo b₆f, y la ATP sintasa (ATPasa). También hay pequeñas moléculas las plastoquinonas (PQ), y proteínas como: plastocinina (PC)/ citocromo c₆ (Cit c₆), ferredoxina o ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) que participan también como transportadores de electrones entre los complejos (DeRuyter y Fromme, 2008). En el proceso cíclico del transporte de electrones también participa un complejo NAD(P)H deshidrogenasa tipo I (NDH-1) (Figura 2).

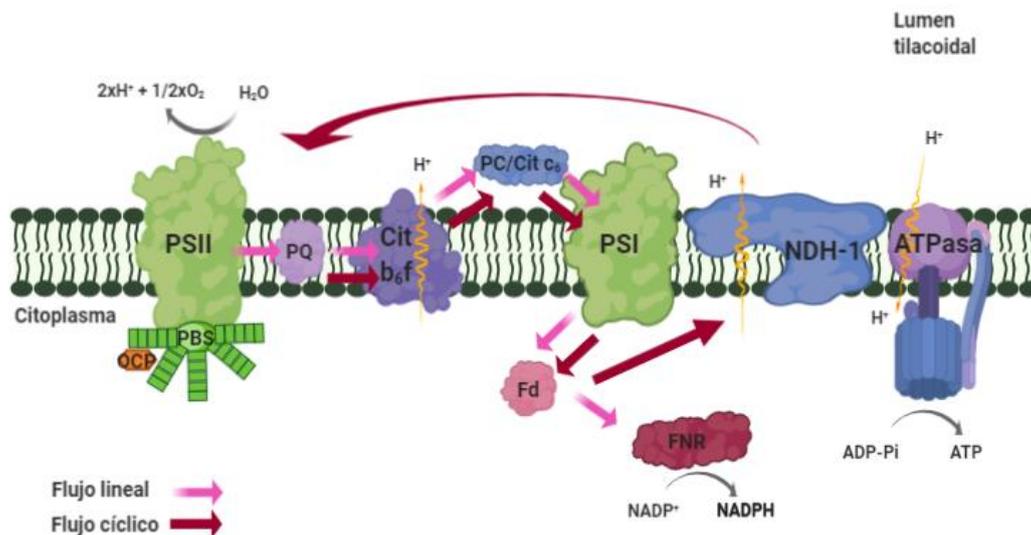


Figura 2. Cadena de transporte electrónico fotosintético en *Synechocystis*. Esquema del transporte electrónico lineal y cíclico cianobacteriano. PSII: fotosistema II; PQ: pool de plastoquinonas; Cit b₆f: citocromo b₆f; PSI: fotosistema I; PC: plastocianina; Cit c₆: citocromo c₆; Fd: ferredoxina; FNR: ferredoxina-NADP⁺ reductasa; NDH-1: NAD(P)H deshidrogenasa tipo I; PBS: ficobilisoma; OCP: proteína carotenoides naranja; ATPasa: ATP sintasa.

En cuanto a la cadena de transporte electrónico respiratorio esta está formada por varios complejos: NAD(P)H deshidrogenasa tipo I (NDH-1), NAD(P)H deshidrogenasa tipo II (NDH-2), succinato deshidrogenasa (SDH), citocromo oxidasas y oxidasas terminales alternativas, además del citocromo b₆f (Vermaas,

2001). Además NDH-1 y SDH se cree que son los principales donadores de electrones en el proceso respiratorio (Cooley y Vermaas, 2001; Liu et al., 2012). En cianobacteria NDH-1 no solo participa en la respiración sino que guarda relación con el flujo cíclico de electrones desde el pool de plastoquinonas al PSI y también está relacionado con la entrada de CO₂ como transportador del mismo (Battchikova et al., 2011; Laughlin et al., 2019). De forma que en la respiración los electrones son dirigidos al pool de plastoquinonas, y de este al citocromo b₆f por NDH-1, NDH2 y SDH. Desde este complejo se dirigirá a la Pc/Cit c₆ y desde ahí puede dirigirse hacia las oxidasas terminales (Liu et al., 2012) (Figura 3). De tal forma que muchos componentes de ambas cadenas son compartidos.

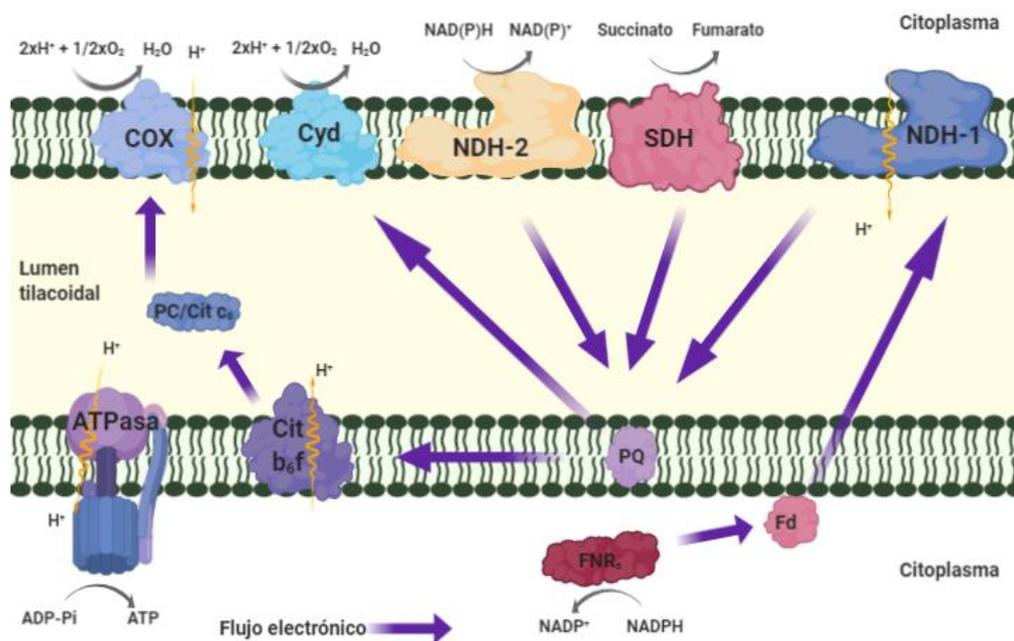


Figura 3. Cadena de transporte electrónico respiratorio en *Synechocystis*. Esquema del transporte electrónico cianobacteriano al realizar la respiración. PQ: pool de plastoquinonas; Cit b₆f: citocromo b₆f; PC: plastocianina; Cit c₆: citocromo c₆; Fd: ferredoxina; FNR_s: ferredoxina-NADP⁺ reductasa, isoforma s; NDH-1: NAD(P)H deshidrogenasa tipo I; ATPasa: ATP sintasa COX: citocromo oxidasa terminal; Cyd: quinol oxidasa; NDH-2: NAD(P)H deshidrogenasa tipo II; SDH: succinato deshidrogenasa.

2.1. Fotosíntesis en cianobacterias.

La fotosíntesis en cianobacterias se caracteriza por dos procesos fundamentales: El transporte cíclico de electrones donde solo se genera ATP y el transporte lineal de electrones donde se genera ATP y NADPH. Además, la otra característica principal es la presencia de ficobilisomas, los complejos captadores de energía. Posteriormente, este poder reductor, así como el ATP, se emplearán para la fijación de carbono.

2.1.1. Los ficobilisomas (PBS) y la OCP.

Las cianobacterias se caracterizan por contar en su membrana tilacoidal, en la superficie citosólica, con complejos extrínsecos denominados ficobilisomas. Estos complejos sirven como antena captando energía luminosa para la fotosíntesis (Adir,

2005; Watanabe y Ikeuchi, 2013) junto con los carotenoides y la clorofila a, aumentando por tanto el espectro de luz que son capaces de captar las cianobacterias respecto a otros organismos fotosintéticos (Zakar et al., 2016). Los PBS se encuentran formados por el ensamblaje de ficobiliproteínas, las cuales cuentan con cromóforos (ficobilinas) y esto hace que sean capaces de captar la energía luminosa, y proteínas que actúan como enlace con los fotosistemas. Los ficobilisomas captan fotones en el intervalo de entre 500-670 nm mientras que la clorofila a de los fotosistemas lo hace en el intervalo de 440 a 680 nm. Dentro de los diferentes tipos de ficobiliproteínas podemos encontrar ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrinas (Li et al., 2019). Estos ficobilisomas se disponen en forma de varilla generada por discos aplanados, transportando así la energía al fotosistema. Además de esta función en la captación de energía los ficobilisomas también actúan como un mecanismo de fotoprotección (Zakar et al., 2016). Estos complejos, dependiendo de los requerimientos energéticos, se cree que pueden rotar al unirse al PSII o PSI (Joshua y Mullineaux, 2004).

Otra proteína relacionada con la cadena de transporte fotosintético es la proteína carotenoides naranja (OCP), que está implicada en la regulación de la transferencia de energía entre ficobilisomas y fotosistemas. La OCP contiene un caroteno que puede cambiar su conformación entre su forma inactiva (OCP^o) y su forma activa (OCP^r). De forma que a altas intensidades luminosas pasa a un estado activo y esto le permite actuar disipando el exceso de energía que llega al PSII en forma de calor (Kirilovsky y Kerfeld, 2013; Kirilovsky, 2015).

2.1.2. El transporte lineal de electrones (LET).

Los tres macrocomplejos implicados en el transporte lineal de electrones son: PSII, citocromo b₆f y PSI. En este proceso se produce la liberación de O₂ a la atmósfera y la generación de poder reductor y energía. En el LET los fotones de luz son tomados por los PBS que excitan a las clorofilas de los centros de reacción de los fotosistemas (P680 y P700, PSII y PSI respectivamente). De forma que desde el centro de reacción del PSII se cede un electrón a la quinona A (Q_A) reduciéndola y esta a su vez se lo cede a Q_B que, tras haber aceptado dos electrones, capta dos protones para formar PQH₂. El PSII es un homodímero constituido por las proteínas D1 y D2, las subunidades antena CP47 y CP43, 12 subunidades pequeñas intrínsecas de membrana (PsbE, PsbF, PsbH-M, PsbN, PsbX, PsbY, PsbZ, y PsbYcf12) y 3 extrínsecas (PsbO, PsbU, y PsbV) (Gao et al., 2018). Cuando el PSII cede el electrón se oxida TyrZ de su subunidad D1 y esta a su vez toma un electrón del cluster de manganeso (Mn₄CaO₅) que une con dos moléculas de agua produciendo su oxidación y, por tanto, rotura. De forma que por cada rotura de una molécula de agua se liberan 2 protones en el lumen tilacoidal y dos electrones (Vinyard et al., 2013). Tras reducirse PQH₂ difunde por la membrana hasta el complejo citocromo b₆f donde la quinona se oxida y deprotona, liberándose estos al lumen del tilacoide. De forma que un electrón es transportado desde el citocromo b₆f (a través de la proteína de Rieske y el citocromo f) a la Pc/Cit c₆ del lumen. El otro electrón es transferido por el grupo hemo al lado citosólico donde se reduce PQ hacia PQH, el proceso se repetirá para generar PQH₂ y se realizará el ciclo de las quinonas. En general 2 PQH₂ se oxidan en el lado luminal liberándose dos PQ, dos electrones que son transferidos a Pc/Cit c₆ y 4 protones en el lumen (Kurisu et al.,

2003). En cianobacterias dependiendo de la disponibilidad de cobre en el medio se expresará PC o, en caso de que no hubiera cobre, Cit c_6 . Ambos actúan con la misma eficiencia para reducir al PSI *in vivo* (Durán et al., 2004). Se cree que la plastocianina, una cuproproteína, surge como un transportador de electrones alternativo al citocromo c_6 debido a la disminución de la biodisponibilidad de hierro originada por la liberación de oxígeno fotosintética (Ochiai, 1983; Crichton y Pierre, 2001). El PSI en cianobacterias se presenta en forma trimérica generalmente, aunque se han determinado casos en lo que aparece en forma di- o tetramérica (Rögner et al., 1990; Malavath et al., 2018; Kato et al., 2019). Está formado por 12 polipéptidos y, de estos, PsaA y PsaB están unidos a P700 (principal donador), al principal aceptor que son dos moléculas de clorofila accesoria y a la filoquinona. Es esta última quien transporta los electrones de la clorofila a los centros sulfoférricos F_x , F_A y F_B y a F_x . Por otro lado, PsaC, PsaD y PsaE están en el lado citosólico. PsaC contiene los centros de hierro-azufre F_A y F_B , PsaF está relacionada con la interacción con Pc/Cit c_6 (en el lumen) y PsaL está encargada de la trimerización de los monómeros. Tras este proceso, por el que P700 excitado cede los electrones a la cadena de transportadores, estos electrones llegarán a la ferredoxina (que se encuentra en la parte citosólica de la membrana) por las proteínas sulfoférricas y de esta a la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) que reducirá NADP⁺ a NADPH, generándose poder reductor (Karapetyan et al., 1999). El centro de reacción del PSI recupera su estado tras aceptar los electrones desde Pc/Cit c_6 (Figura 2). Durante todo este proceso se ha producido un gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoidal por los protones generados de la fotólisis del agua y del ciclo de las quinonas entre PQH₂ y el citocromo b_6/f , este gradiente será empleado por la ATPasa para la síntesis de ATP. De forma que se necesitan 4 protones para sintetizar una molécula de ATP (Van Walraven et al., 1996) y por cada ciclo de fotólisis se obtiene un gradiente de 6 protones .

2.1.3. El transporte cíclico de electrones (CET).

El transporte cíclico de electrones da lugar a la generación de ATP por un gradiente electroquímico como en el caso del LET pero sin la generación de poder reductor. Así, en el transporte lineal se genera una relación media de 1,33 moléculas de ATP y 1,5 moléculas de NADPH (Bendall y Manasse, 1995). Puesto que en el Ciclo de Calvin-Benson-Bassham se emplean 1,5 moléculas de ATP por cada molécula de NADPH y que el ATP es necesario para otros procesos celulares la generación de energía de forma independiente a la del poder reductor es necesaria para los organismos fotosintéticos (Nawrocki et al., 2019). Este ciclo se genera mediante el regreso de los electrones del PSI al pool de plastoquinonas generándose también un potencial en la membrana por el bombeo de protones, aunque ya no participa la fotólisis del agua (Nawrocki et al., 2019). En este proceso participa el complejo NDH-1 que transfiere los electrones al pool de plastoquinonas (Peltier et al., 2016; Laughlin et al., 2019). Para que este proceso sea posible de forma cíclica NDH-1 recibe los electrones de la ferredoxina , que a su vez los recibe de PSI (He et al., 2015; Laughlin et al., 2019).

2.2. Fijación de carbono en cianobacterias por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB).

En los organismos fotosintéticos se emplea el poder reductor en forma de NADPH y la energía en forma de ATP generados en la cadena de transporte electrónico para la fijación de carbono inorgánico. Este proceso se realiza a través del ciclo de CBB, de forma que este es un ciclo cuya regulación tiene gran importancia para el metabolismo de los organismos fotosintéticos.

El CBB comienza con la actividad RuBisCO (formada por sus dos subunidades RbcL, que contiene el centro activo, y RbcS, una subunidad regulador (Andersson y Backlund, 2008). Esta enzima cataliza la entrada del CO₂ atmosférico en un esqueleto carbonado orgánico, la ribulosa-1,5-bisfosfato (Ru-1,5-BP). De forma general este proceso es realizado en el carboxisoma y de él se generan dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PG), constituyendo la etapa de fijación del carbono. La mayor o menor presencia de carboxisomas depende de la concentración de bicarbonato y CO₂ en el medio, disminuyendo esta cuando uno u otro son altos. Tras esto se da una etapa de reducción donde desde las moléculas generadas se originan 2 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P) con un gasto de poder reductor y ATP. Posteriormente continua la fase de regeneración que tiene como fin la regeneración de Ru-1,5-BP (Figura 4). En esta, una molécula de G-3-P y otra de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se unen mediante una aldolasa generando fructosa-1, 6-bisfosfato que será desfosforilada por una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa hasta fructosa-6-fosfato (F-6-P). La DHAP puede obtenerse a partir del G-3-P mediante la enzima triosa fosfato isomerasa. Esta F-6-P y G-3-P, mediante una enzima transcetolasa, generarán una molécula de 4 átomos de carbono (eritrosa-4-fosfato o E-4-P) y una de cinco (xilulosa-5-fosfato o Xu-5-P). Posteriormente, E-4-P se combina mediante una actividad aldolasa con otra de las moléculas DHAP generadas para dar lugar a la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (S-1, 7-BP) que será desfosforilada por una actividad sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa a sedoheptulosa-7-fosfato (S-7-P). La sedoheptulosa generada, mediante una actividad transcetolasa, se combina con un G-3-P, para generar Xu-5-P y ribosa-5-fosfato (R-5-P), ambas pentosas darán lugar a la ribulosa-5-fosfato (Ru-5-P) mediante una actividad epimerasa e isomerasa respectivamente. Finalmente, con gasto de ATP, esta Ru-5-P se fosforila mediante la enzima fosforribuloquinasa hasta Ru-1,5-BP. De esta forma se completa un ciclo cerrado donde por cada 3 moléculas de CO₂ fijadas se genera de forma neta una triosa fosfato (Raines, 2003; Michelet et al., 2013). De forma que por cada tres moléculas de CO₂ fijadas se produce en esta etapa el gasto de 9 ATP y 6 NADPH, generando 6 moléculas de G-3-P donde una de ellas no continua el ciclo y se libera para la síntesis de compuestos de interés.

Este carbono fijado se emplea para la síntesis de diversos compuestos (ácidos grasos, aminoácidos, ácidos nucleicos...) y, normalmente, parte del mismo se convierte en glucógeno para su almacenaje. De esta forma puede utilizarse este carbono cuando fuera necesario o en oscuridad (Ball y Morell, 2003). La síntesis de glucógeno comienza en el citoplasma con la síntesis de ADP-glucosa desde glucosa-1-fosfato con gasto de ATP; la enzima que cataliza esta reacción es la ADP-glucosa pirofosforilasa. Posteriormente la glucógeno sintasa (de la que *Synechocystis* cuenta con dos isoformas) une los residuos de glucosa, que toma en forma de ADP-glucosa, con enlace glucosídico α -1,4 sobre glucógeno existente (Yoo et al., 2014). Finalmente la enzima ramificante añade los enlaces α -1,6. Cuando la movilización del glucógeno es necesaria intervienen las enzimas GlgP, que cataliza la liberación de glucosa-1-fosfato, y GlgX, que es la enzima desramificante (Fu y

Xu, 2006). El glucógeno presenta un patrón de síntesis por el día y degradación durante la noche o en periodos de oscuridad (Sarkar et al., 2019). Además para mantener el equilibrio carbono/nitrógeno su acumulación se relacionará con la limitación de nitrógeno en cianobacterias, situación en la que se acumula a una alta concentración (Gründel et al., 2012).

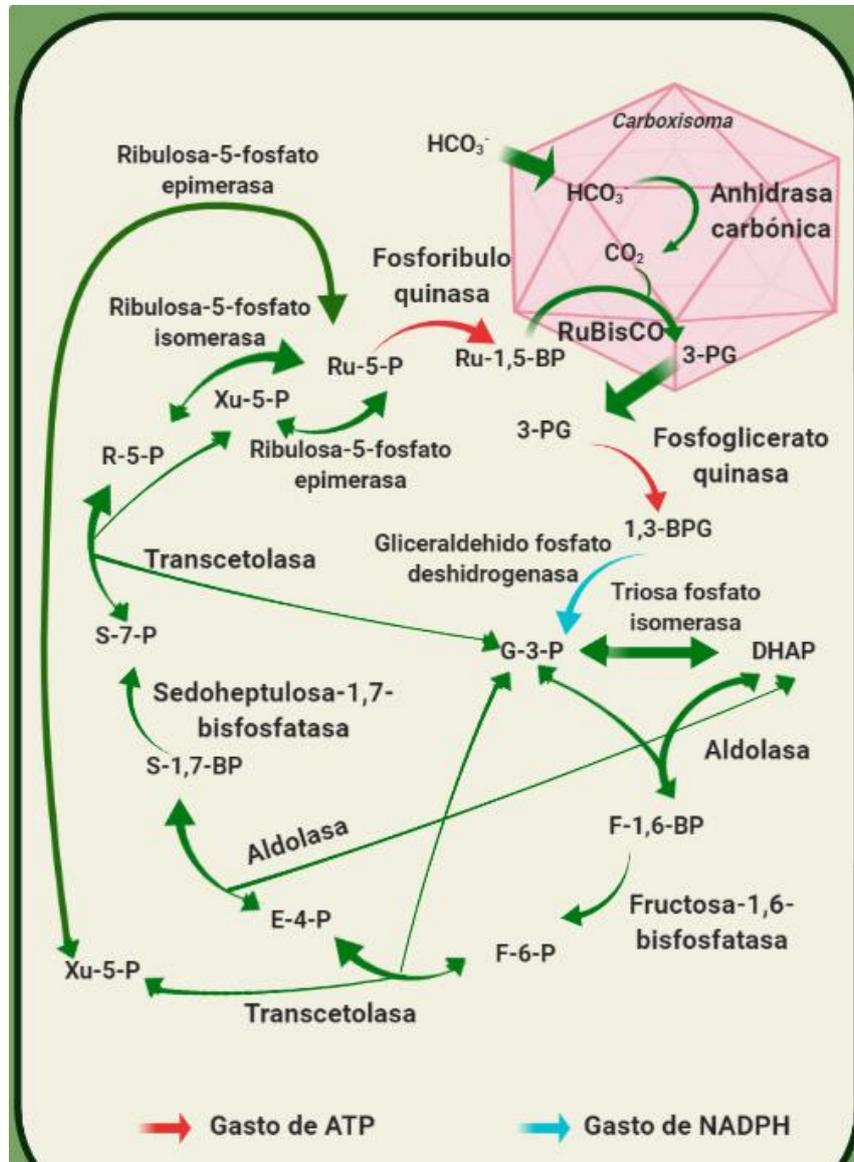


Figura 4. Ciclo de Calvin-Benson-Bassham en cianobacterias. Esquema del ciclo de fijación de carbono en *Synechocystis*. F-6-P: fructosa-6-fosfato; F-1,6-BP: fructosa 1,6-bisfosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G-3-P: gliceraldehido-3-fosfato; 1,3BPG: 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PG: 3-fosfoglicerato; E-4-P: eritrosa-4-fosfato; Xu-5-P: xilulosa-5-fosfato; S-1,7-BP: sedoheptulosa-1,7-bisfosfato; S-7-P: sedoheptulosa-7-fosfato; R-5-P: ribosa-5-fosfato; Ru-5-P: ribulosa-5-fosfato; Ru-1,5-BP: ribulosa-1,5-bisfosfato. En cianobacterias la actividad FBPasa y SBPasa corresponden a la misma enzima.

En plantas se ha determinado que varias de las enzimas que participan en este ciclo presentan regulación luz/oscuridad, es decir, sus actividades enzimáticas actúan durante las horas de luz debido a su regulación por reducción-oxidación (regulación redox). Estas enzimas reguladas serían la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa (RuBisCO), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH),

fosforribuloquinasa (PRK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa) (Michelet et al., 2013).

2.2.1. Sistemas de concentración de carbono.

La enzima RuBisCO además de su actividad carboxilasa presenta también actividad oxigenasa, de forma que en lugar de la reacción anterior por la que fija el carbono esta enzima es capaz de sintetizar la incorporación de oxígeno a la ribulosa-1,5-bisfosfato, generándose 2-fosfoglicolato. Este compuesto de 2C es tóxico pues inhibe a la triosa fosfato isomerasa y a la fosfofructoquinasa (Anderson, 1971; Kelly y Latzko, 1976). *Synechocystis* cuenta con 3 rutas que constituyen el metabolismo de fotorrespiración de este compuesto para eliminarlo y evitar su toxicidad, de forma que además del ciclo C2 característico de las plantas (donde se regenera 3-PG con pérdida de carbono) (Bauwe et al., 2010) también posee la ruta del glicerato bacteriana y además, es capaz de descarboxilar el glioxilato por la vía del oxalacetato (Eisenhut et al., 2008). Para evitar estos procesos y la consiguiente pérdida de carbono la fijación de este se realiza en el carboxisoma, compartimento icosaédrico donde se encuentra la RuBisCO. El sistema proteico de concentración de CO₂, o CCM, está compuesto por bombas de bicarbonato asociadas a la membrana y el carboxisoma. Es este último, además de la RuBisCO se encuentra la anhidrasa carbónica, favoreciendo así un ambiente donde la concentración de CO₂ sea alta y se dificulte la actividad oxigenasa de la RuBisCO (Kupriyanova et al., 2013; Kerfeld y Melnicki, 2016; Long et al., 2016). Los genes que codifican para las proteínas que encapsulan a la RuBisCO están presentes en el operón *ccm* (Whitehead et al., 2014; Kerfeld y Melnicki, 2016). El C_{inorgánico} citosólico acumulado por los sistemas de entrada del mismo (transportadores) difunde al carboxisoma donde la anhidrasa carbónica, cerca de la RuBisCO, unida a la estructura del carboxisoma (Cai et al., 2016) transforma HCO₃⁻ en CO₂, tras esto la enzima realiza la reacción de carboxilación (Figura 4). Además la estructura del carboxisoma impide la salida del CO₂, favoreciendo así su concentración (Cai et al., 2009). Respecto a los transportadores de carbono en la membrana podemos distinguir: SbtA (Shibata et al., 2002), BicA (Price et al., 2004), NDH-1₄ (Burnap et al., 2015), NDH-1₃ (Maeda et al., 2002; Prommeenate et al., 2004; Burnap et al., 2015) y BCT1, codificado por el operón *cmpABCD* (Omata et al., 1999).

2.3. Respiración en cianobacterias.

En las cianobacterias los procesos de fotosíntesis y respiración están localizados en el mismo compartimento celular, en la misma membrana y compartiendo sistemas de transporte electrónico como son el pool de plastoquinonas, el citocromo b₆f y P_c/Cit c₆ (Scherer, 1990; Peschek et al., 2004). Serán NDH-1, NDH-2 (mediante la oxidación de NAD(P)H) y SDH (succinato deshidrogenasa, mediante la transformación de succinato a fumarato) quienes van a reducir en oscuridad al pool de plastoquinonas mediante el proceso respiratorio (Figura 3), puesto que la inactivación de cualquiera de estos complejos se relaciona con disminución de la capacidad respiratoria (Cooley y Vermaas, 2001; Peltier et al., 2016). Se especula que FNR_s, una de las dos isoformas de FNR en *Synechocystis* que es capaz de oxidar el NADPH y se acumula durante el crecimiento heterotrófico, podría participar

en la respiración mediante la reducción de la ferredoxina que le donaría estos electrones a NDH-1 (Thomas et al., 2006; Korn, 2010; Laughlin et al., 2019) (Figura 3). La respiración ayuda a mantener el gradiente de protones que permitirá la producción de ATP y el poder reductor se obtendrá mediante las reacciones catabólicas.

2.3.1. Oxidasas terminales respiratorias.

Hay dos tipos principales de oxidasas terminales respiratorias: una representada por la superfamilia de oxidasas tipo citocromo c (COX) y la otra por las del tipo quinol bd (Cyd), siendo las primeras capaces de bombear protones al lumen tilacoidal.

Las COX además de realizar el bombeo de protones de forma acoplada reducen el oxígeno para generar agua. Estas oxidasas son capaces de usar al sistema Pc/Cit c_6 como donador de electrones y se caracterizan por contar con dos centros hemo redox donde uno de ellos participa en la organización del centro catalítico binuclear que consiste en un ion hierro (del grupo hemo) y un ion cobre localizados de forma cercana. El otro grupo hemo será quien tome los electrones del donador (Lockau, 1981; Michel et al., 1998).

Las Cyd se caracterizan por ser capaces de reducir moléculas de oxígeno para generar agua y tienen como donadores de electrones a los grupos quinol (Abramson et al., 2000), de forma que obtienen los electrones necesarios para reducir al oxígeno del *pool* de plastoquinonas reducidas. En su centro de reacción cuentan con dos grupos hemo y no participa en el bombeo de protones para generar energía (Musser et al., 1993).

Ambas oxidasas terminales participan en la protección frente a especies reactivas de oxígeno del sistema fotosintético sirviendo como fuente de salida de electrones en condiciones donde haya un exceso de estos (Ermakova et al., 2016; Shimakawa y Miyake, 2018). Sin embargo la afinidad de estas por el oxígeno es diferente, así la K_M para el mismo en *Synechocystis* de COX es de 1,0 μ M mientras que el de Cyd es de 0,35 μ M (Pils y Schmetterer, 2006).

3. Metabolismo del carbono en cianobacterias

Además del proceso de fijación de carbono que se realiza durante el ciclo de CBB hay otros procesos donde están implicados esqueletos carbonados en cianobacterias como son la ruta de las pentosas fosfato (OPP), la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la ruta de Entner-Doudoroff (ED) o el ciclo de Krebs (Figura 5). De forma general en condiciones de crecimiento fotoautotrófico con suficiente luz estas rutas apenas contribuyen al flujo metabólico total de las cianobacterias (Yang et al., 2002).

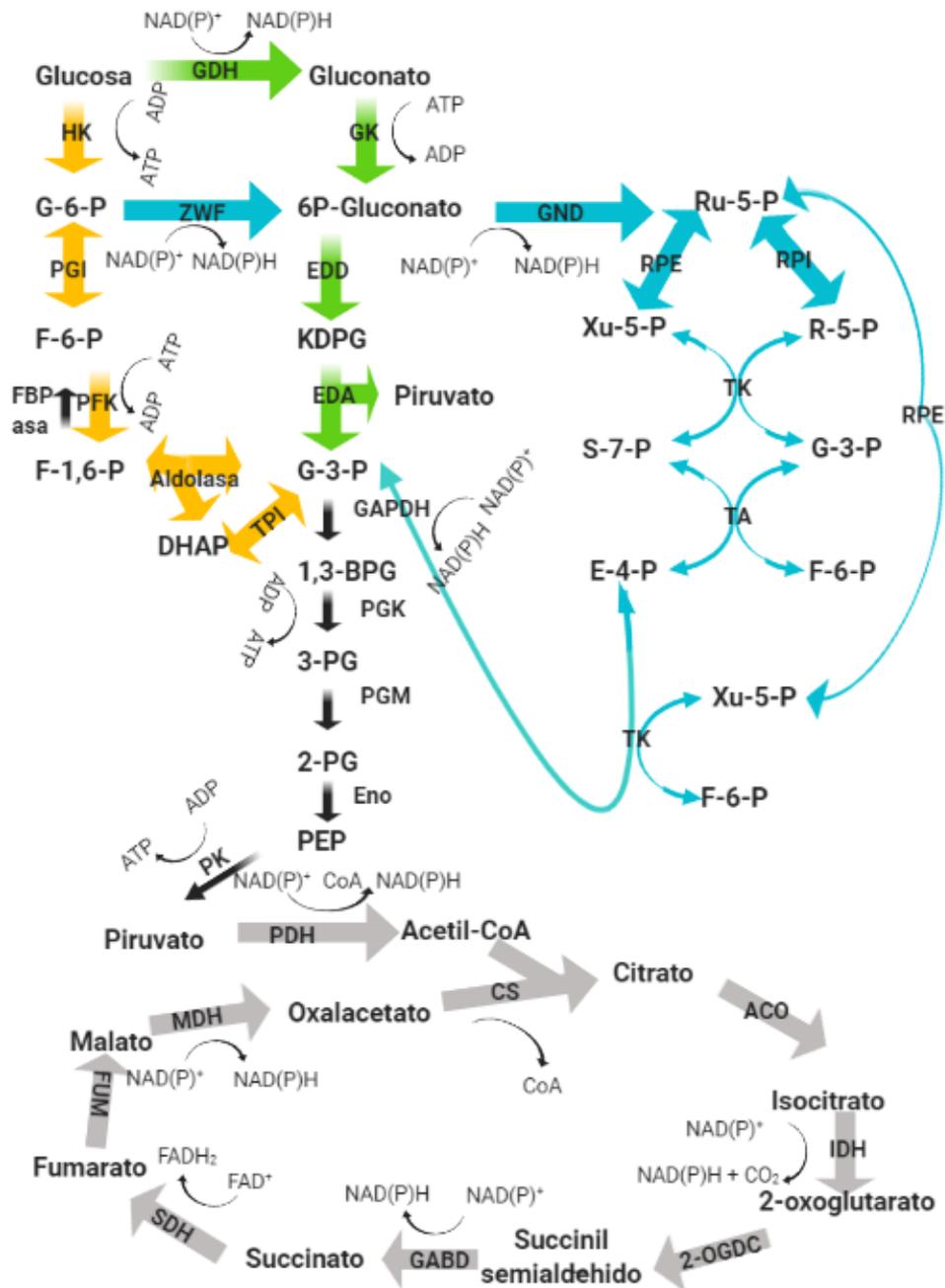


Figura 5. Esquema de las rutas de asimilación del carbono en *Synechocystis*. De color amarillo está representada la ruta Embden-Meyerhof-Parnas, de color azul la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, de verde la ruta de Entner-Doudoroff y de gris el ciclo de Krebs. PDH: piruvato deshidrogenasa; CS: citrato sintasa; ACO: aconitasa; IDH: isocitrato deshidrogenasa; 2-OGDC: 2-oxoglutarato descarboxilasa; GABD: succinato semialdehido deshidrogenasa; FUM: fumarasa; MDH: malato deshidrogenasa; PK: piruvato quinasa; Eno: enolasa; PGM: fosfoglicerato mutasa; PGK: fosfoglicerato quinasa; GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; TPI: triosas fosfato isomerasa; PFK: fosfofructoquinasa; PGI: fosfoglucoisomerasa; HK: hexoquinasa; GDH: glucosa deshidrogenasa; GK: gluconato quinasa; EDD: 6-fosfogluconato deshidratasa; KDPG: 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato; EDA: KDPG aldolasa; ZWF: engloba las actividades de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la gluconolactonasa; GND: 6-fosfogluconato deshidrogenasa; RPE: ribulosa-5-fosfato epimerasa; RPI: ribulosa-5-fosfato isomerasa; TK: transcetolasa; TA: transaldolasa; FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa; G-6-P: glucosa-6-fosfato; F-6-P: fructosa-6-fosfato; F-1,6-BP: fructosa-1,6-bisfosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G-3-P: gliceraldehido-3-fosfato; 1,3-BPG: 1,3-

bisfosfoglicerato; 3-PG: 3-fosfoglicerato; 2-PG: 2-fosfoglicerato; PEP: fosfoenolpiruvato; Ru-5-P: ribulosa-5-fosfato; R-5-P: ribosa-5-fosfato; Xu-5-P: xilulosa-5-fosfato; S-7-P: sedoheptulosa-7-fosfato; E-4-P: eritrosa-4-fosfato.

3.1. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPP)

La ruta oxidativa de las pentosas fosfato es una vía catabólica de asimilación de glucosa donde se generan diversos intermediarios que pueden emplearse para la síntesis de otros compuestos, entre otros, los ácidos nucleicos. Durante esta ruta se genera poder reductor en forma de NADPH de forma que puede ser empleada para regenerar este poder reductor cuando sea necesario en condiciones de oscuridad donde la fotosíntesis no sea funcional (Kruger y Von Schaewen, 2003). Podemos diferenciar principalmente dos fases en la misma: fase oxidativa donde se sintetiza NADPH y la fase de interconversión donde se generan los distintos esqueletos carbonados. En la primera fase estarían implicadas la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH), la gluconolactonasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH); al final de estas transformaciones se obtiene 2 NADPH y ribulosa-5-fosfato, perdiéndose un carbono como CO₂. La otra fase comprende una serie de reacciones reversibles donde finalmente se obtiene G-3-P y fructosa-6-fosfato (F-6-P) (Figura 5). En caso de que se necesite regenerar poder reductor empleando enzimas de la gluconeogénesis como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) podría generarse un ciclo continuo de la OPP con pérdida de carbono (Kruger y Von Schaewen, 2003). Se ha demostrado que la primera enzima de esta ruta, G-6-PDH es susceptible tanto de regulación redox como de regulación alostérica. Así, en *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 y *Anabaena*, se ha determinado que esta proteína presenta un regulador alostérico positivo, OpcA (proteína conservada y específica de cianobacterias), que al interaccionar con la misma potencia su actividad. Además, al estar presente permite la acción de las tiorredoxinas sobre la G-6-PDH, enzima que es activa cuando está oxidada. Por tanto el efecto de las tiorredoxinas en esta proteína de la ruta produce una inactivación de la misma, aunque este efecto solo se ha demostrado en presencia de OpcA (Hagen y Meeks, 2001; Mihara et al., 2018). Además, se ha demostrado que esta enzima, a pesar de poder emplear tanto NADP⁺ como NAD⁺, presenta una mayor afinidad por NADP⁺, como ocurre con la 6-PGDH (Ito y Osanai, 2020). Además, tanto NADPH como NADH son inhibidores de las mismas, lo que favorece su inactivación cuando se realiza la fotosíntesis (Ito y Osanai, 2020). De estas enzimas también destaca su regulación por diferentes metabolitos, en su mayoría intermediarios del ciclo TCA. Así, la actividad de la G-6-PDH está regulada negativamente por fosfoenolpiruvato, oxalacetato, citrato y 2-oxoglutarato. Por otro lado, la actividad de 6-PGDH se regula negativamente por oxalacetato, citrato y 2-oxoglutarato (Ito y Osanai, 2020). La relación entre esta vía y el ciclo de Krebs no solo se establece mediante estos compuestos sino que los mutantes carentes de la primera enzima de la ruta al pasar de condiciones de luz a condiciones de oscuridad acumulan intermediarios del ciclo de Krebs, por lo que ambas podrían ser rutas alternativas en oscuridad para la metabolización de glucosa (Maruyama et al., 2019).

Estudios metabólicos demuestran que esta vía en cianobacterias no estaría activa en condiciones de fotoautotrofia (Yang et al., 2002). Se especula que su

principal función se realizaría en condiciones de crecimiento fotomixotrófico o heterotrofia. Aun así, solo se ha observado un flujo significativo por esta vía a una intensidad luminosa igual o menor de $40 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Nakajima et al., 2014, 2017; You et al., 2014), incluso en presencia de glucosa. Todo esto, unido al hecho de que el mutante de la primera enzima de la ruta no es capaz de crecer en baja luz y mixotrofia o heterotrofia parece indicar que esta ruta actuaría en condiciones de baja luz, donde se produciría la degradación del glucógeno para generar NADPH (Wan et al., 2017; Ueda et al., 2018; Makowka et al., 2020). Por otro lado, algunos estudios señalan a esta ruta, junto con ED, como la encargada de metabolizar el carbono acumulado en forma de glucógeno tras periodos de falta de nitrógeno en el medio (Doello et al., 2018). Además, esta ruta es necesaria en la transición de oscuridad a luz para degradar el glucógeno y permitir así la obtención de los esqueletos carbonados necesarios para la fotosíntesis (Shinde et al., 2020).

3.2. Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glucólisis.

La ruta de Embden-Meyerhof-Parnas es una ruta catabólica en la que se oxida glucosa para obtener poder reductor (NAD(P)H) y energía (ATP). De forma general esta ruta está relacionada con la respiración. En ella podemos distinguir dos fases: una primera donde se transforma la molécula de glucosa en dos moléculas de triosa fosfato con gasto de dos moléculas de ATP y otra segunda fase donde se obtienen cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de NAD(P)H; de forma que el balance total de la ruta es de positivo para la generación de energía y poder reductor (Figura 5) (Romano y Conway, 1996).

En esta ruta todas las enzimas son bidireccionales con respecto a las de la gluconeogénesis excepto la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa (PFK) que se intercambian por la glucosa-6-fosfatasa y por la FBPasa (Bennett et al., 2010). Se ha demostrado que esta vía no se encuentra presente en todas las cianobacterias. Algunas cianobacterias como las del género *Prochlorococcus* carecen de la enzima PFK de forma que no sería posible realizar esta ruta para ellas (Chen et al., 2016). De forma que sugieren que sería la ruta de Entner-Doudoroff la principal encargada, junto con la OPP, de metabolizar la glucosa en estas especies. Puesto que estas estirpes suelen habitar en zonas con una menor presencia de nutrientes la ruta ED podría estar más favorecida termodinámicamente (Chen et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios señalan que esta ruta podría tener una alta implicación en el metabolismo de la glucosa en crecimiento mixotrófico para la generación de intermediarios de la fijación del carbono (Ge et al., 2018). Además, análisis de flujo en estas condiciones, tanto en alta como en baja luz, demuestran la existencia de un flujo por la ruta EMP; especialmente en alta luz (Wan et al., 2017; Ueda et al., 2018).

El hecho de que tanto esta ruta como la ruta OPP compartan intermediarios con el ciclo CBB hace posible que además de la generación de energía y poder reductor provean al ciclo CBB de los metabolitos necesarios para que, en condiciones de luz (tras la noche), el ciclo de fijación de carbono funcione adecuadamente o se reactive. De esta forma el ciclo de CBB dispondría de los esqueletos carbonado necesario para fijar CO_2 atmosférico. La degradación del glucógeno por tanto proveerá de

energía y de los esqueletos carbonados (Shimakawa et al., 2014; Sarkar et al., 2019; Makowka et al., 2020).

3.3. Ruta de Entner-Doudoroff (ED).

La ruta de Entner-Doudoroff es una ruta catabólica que transforma glucosa en piruvato. Esta ruta comparte un intermediario con la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, el 6-fosfogluconato, a pesar de que en este caso este intermediario se obtiene desde la glucosa mediante la actuación de dos enzimas (Figura 5). Finalmente, de esta vía se obtiene piruvato y G-3-P a partir de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. El G-3-P puede seguir por la vía glucolítica para obtener poder reductor o ATP, obteniéndose una molécula de ATP y 2 de NADPH (Conway, 1992). Recientemente se ha descubierto que esta ruta también está presente en cianobacterias y plantas (Chen et al., 2016).

Estudios recientes han relacionado esta vía con la degradación del glucógeno en fotoautotrofia o la movilización del mismo tras largos periodos de déficit de nitrógeno, situación donde se acumula el glucógeno (Doello et al., 2018; Makowka et al., 2020). De tal forma que se cree que estaría implicada en la utilización de glucógeno en cianobacterias estando operativo el ciclo de CBB, pues al no compartir intermediarios con el mismo se favorecería que actuara esta ruta y no una de las anteriores.

3.4. Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA).

Este ciclo en cianobacterias presenta diferencias con respecto a otras bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*) o en células eucariotas. A diferencia de estos organismos las cianobacterias carecen de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa que cataliza uno de los pasos del ciclo, la conversión de 2-oxoglutarato en succinil-CoA. A pesar de esto algunas cianobacterias, como *Synechocystis*, cuentan con los genes que codifican para las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa (2-OGDC) y succinato semialdehído deshidrogenasa (GABD), donde la primera transforma 2-oxoglutarato en succinil semialdehído y la segunda transforma este en succinato (Figura 5) (Zhang y Bryant, 2011; Ito et al., 2019). A diferencia de de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa del ciclo canónico, donde se produce una molécula de GTP y otra de NADH en este solo se generaría una molécula de NADPH; además, como en el ciclo de Krebs canónico se generan dos moléculas más de NADPH y una de FADH₂ (Zhang y Bryant, 2011). Sin embargo, el flujo a través de este cierre de ciclo es bajo y, por tanto, en cianobacterias es, principalmente, un ciclo abierto. Una de las diferencias del ciclo de Krebs en cianobacterias, con respecto al ciclo de Krebs en organismos heterótrofos, es que se ha demostrado que la enzima encargada de generar succinato, la isocitrato deshidrogenasa y las deshidrogenasas del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, unen preferentemente NADP⁺ con respecto a NAD⁺ como coenzima (Ito y Osanai, 2020). Las cianobacterias también presentan la enzima succinil-CoA deshidrogenasa, enzima reversible que cataliza la conversión de succinil-CoA en succinato, ya que es requerida para sintetizar ciertos aminoácidos (Zhang et al., 2016).

Este ciclo, a diferencia de los anteriores, no presenta variaciones en su flujo dependiendo de las condiciones nutricionales mientras el resto de los ciclos puedan realizarse con normalidad. Esto se debe a que la afinidad por NADP⁺ de la enzima encargada de generar succinato es menor que la afinidad de las deshidrogenasas de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, lo que señala que la ruta OPP es preferencial cuando está activa (Ito y Osanai, 2020). Por tanto hay un nivel basal de flujo por este ciclo que se mantiene constante independientemente de la intensidad luminosa, la presencia de glucosa en el medio o el consumo de glucógeno (You et al., 2014; Wan et al., 2017; Ueda et al., 2018). Sin embargo, recientemente se ha relacionado un intermediario de esta ruta con la posible regulación negativa de una enzima que participa en la fijación de carbono, la PRK (Nishiguchi et al., 2020). De forma que, *in vitro*, se ha determinado que el isocitrato sintetizado en el Ciclo de Krebs es capaz de regular negativamente la actividad de dicha enzima por lo que podría haber una regulación de la fijación de carbono dependiente de este ciclo.

4. Regulación redox del metabolismo del carbono en cianobacterias.

Las cianobacterias son organismos con capacidad de crecimiento fotoautotrófico capaces de adaptarse a una gran variedad de cambios en su entorno. Para poder sobrevivir a estos cambios regulan la actividad de algunas enzimas de sus diversas rutas. Uno de los mecanismos que les permite realizar esto es el control redox de sus proteínas. Los principales mecanismos implicados en esta regulación en los organismos fotosintéticos son el sistema tiorredoxina (Trx) y el otro constituido por el glutatión y las glutarredoxinas (Grx) (Meyer et al., 2009; Montrichard et al., 2009; Ströher y Millar, 2012; Cejudo et al., 2019; Jedelská et al., 2020).

La regulación redox es posible a través de la oxidación y reducción de los grupos tiol de las cisteínas de las proteínas a regular. Este grupo puede presentar distintas formas dependiendo de su estado de oxidación y esto hace que pueda verse alterada la estructura de la proteína que lo contenga. Por tanto, las cisteínas en su forma oxidada pueden formar puentes disulfuro con otras cisteínas de forma intramolecular o intermolecular. Sin embargo al reducirse el enlace disulfuro se rompe, lo que puede ocasionar la activación o inactivación de su función enzimática (Couturier et al., 2013). Este proceso es reversible, aunque los grupos tiol pueden sufrir oxidaciones irreversibles. Estos procesos irreversibles son la sobreoxidación de las cisteínas generando ácido sulfínico (Cys-SO₂H) o ácido sulfónico (Cys-SO₃H) es un proceso irreversible que conlleva la degradación de la proteína (Poole et al., 2004), excepto el ácido sulfínico generado en las cisteínas catalíticas de algunas peroxirredoxinas que puede ser reducido por las sulfirredoxinas con gasto de ATP (Wood et al., 2003).

A pesar de existir estudios que identifican a posibles dianas de tiorredoxinas en *Synechocystis* (Lindahl y Florencio, 2003; Li et al., 2007; Pérez-Pérez et al., 2009a), posteriormente no se ha comprobado que todas estas dianas sean reales. De modo que en lo relativo a los ciclos del carbono solo se ha demostrado *in vitro* la regulación redox de la enzima que codifica para las actividades fructosa-1,6-bisfosfatasa/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa cianobacteria (FBP/SBPasa) (Udvardy et al., 1982), la G-6-PDH (Hagen y Meeks, 2001), la ADP-glucosa pirofosforilasa

(AGP) (Díaz-Troya et al., 2014) y la fosforribuloquinasa (Kobayashi et al., 2003). Sin embargo estudios proteómicos han puesto de manifiesto el cambio redox por luz/oscuridad en cisteínas de varias enzimas implicadas en el ciclo del carbono como son: glucógeno sintasa o GlgA2 (ya que *Synechocystis* cuenta con 2 isoformas), 6-PGDH, la subunidad grande de la RuBisCO, piruvato quinasa, PFK, fructosa-bisfosfato aldolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 1, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 2, fosfoglucomutasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitato hidratasa tipo I, fumarato hidratasa tipo II, triosa fosfato isomerasa (Guo et al., 2014) y PRK (Reichmann y Jakob, 2012; López-Calcano et al., 2014; Mihara et al., 2020)

4.1. Regulación enzimática mediada por tiorredoxinas.

Las tiorredoxinas son proteínas globulares pequeñas (≈ 12 kDa) presentes en todos los organismos (Montrichard et al., 2009). La principal característica de estas proteínas, además de su plegamiento, es su sitio activo que presenta una secuencia conservada WC(G/P)C. Estas cisteínas conservadas del sitio activo pueden estar oxidadas o reducidas y son capaces de regular a sus proteínas diana mediante la reducción de puentes disulfuro (Figura 6) (Couturier et al., 2013). La reducción llevada a cabo por estas proteínas es secuencial, de forma que la cisteína más cerca al extremo N-terminal realizará un ataque nucleofílico sobre el puente disulfuro de la proteína a regular quedando ambas proteínas unidas de forma transitoria. El puente disulfuro generado entre ambas proteínas es atacado por la segunda cisteína de la tiorredoxina quedando la misma con un puente disulfuro y la proteína diana reducida (Holmgren, 1995). En organismos fotosintéticos, como las cianobacterias, son capaces de relacionar a sus proteínas diana con la situación energética ambiental ya que la ferredoxina, al reducirse por la luz, es capaz de aportar los electrones necesarios para que se lleve a cabo la reducción de la tiorredoxina en una reacción catalizada por Ferredoxina-Tiorredoxina-Reductasa (FTR) (Figura 6). Una vez reducida por sus donadores la tiorredoxina será capaz de reducir a otras proteínas, afectándose así la actividad de estas. En plantas se ha demostrado que las tiorredoxinas interaccionan con muchas proteínas del ciclo de CBB, produciendo la activación de las mismas por luz (por ejemplo a la FBPasa o SBPasa cloroplastídicas por Trx *f*) (Wolosiuk y Buchanan, 1977; Buchanan et al., 2000; Montrichard et al., 2009; Gutle et al., 2016). Además estas proteínas están relacionadas con otros procesos distintos a los ciclos del carbono en organismos fotosintéticos como el estrés, oxidativo controlando la actividad de proteínas que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (peroxirredoxinas, 1-cys peroxirredoxina...), regulando a la metionina sulfóxido reductasa o a la 3'-fosfoadenilsulfato reductasa (Pérez-Pérez et al., 2009b; Sevilla et al., 2015).

En plantas superiores existen varias familias de Trx: dentro de los plastos podemos encontrar los tipos: *f*, *m*, *y*, *x* y *z*. Además las plantas superiores presentan tiorredoxinas en otras localizaciones como la mitocondria (Trx *o*) o el citosol (Trx *h*) (Serrato et al., 2013). A través de los estudios realizados con las tiorredoxinas de plantas se ha determinado que las Trx *f* y Trx *m* serían las encargadas de regular las enzimas del ciclo de CBB, la síntesis de almidón o la síntesis de ATP. Siendo las tipo *m* las que regulan rutas más divergentes como son incluso el desarrollo de los tejidos (Geigenberger et al., 2017)

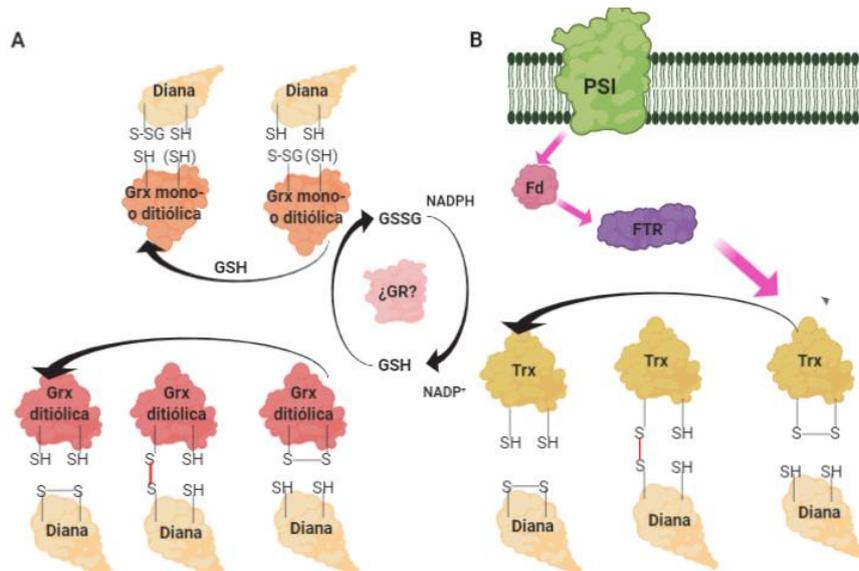


Figura 6. Mecanismos de reacción con proteínas de las tiorredoxinas y glutarredoxinas de cianobacterias. (A) Esquema de los mecanismos de reducción sobre las cisteínas de sus proteínas diana de las glutarredoxinas mono- y ditiólicas. Incluye tanto el proceso de reducción de puentes disulfuro como de deglutationilación, así como su regeneración. **(B)** Esquema de los mecanismos de reducción sobre las cisteínas de sus proteínas diana de las tiorredoxinas, así como su regeneración. PSI: fotosistema I; Fd: ferredoxina; FNRs: ferredoxina-NADP⁺ reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión disulfuro; GRX: glutarredoxina; Trx: tiorredoxina.

Las cianobacterias presentan una variedad menor de tiorredoxinas, que incluye cuatro familias: las tipo *m* (la única presente en todas las cianobacterias), las tipo *x*, las tipo *y* y TrxC, que es exclusiva de cianobacterias (Florencio et al., 2006; López-Maury et al., 2018). Estudios basados en análisis filogenético demostraron que las Trx plastídicas tienen su origen en procariotas, de forma que estas serían aquellas que propiciaron los diferentes tipos de tiorredoxinas de plantas y algas (Serrato et al., 2013). Las tiorredoxinas tipo *m*, *x* e *y* presentan la secuencia conservada en su centro catalítico, mientras que TrxC presenta una secuencia alterada WCGLC. TrxC está relacionada con la adaptación a condiciones de bajo carbono y alta luz, aunque no presenta una actividad tiorredoxina clásica *in vitro* (López-Maury et al., 2018). *Synechocystis* presenta 4 tiorredoxinas: una tiorredoxina tipo *m* designada TrxA (*slr0629*), una tiorredoxina tipo *x* designada TrxB (*slr1139*), una tiorredoxina tipo *y* designada TrxQ (*slr0233*) y TrxC (*sll1057*) (Florencio et al., 2006). TrxB y TrxQ están relacionadas con respuesta a alta luz y estrés oxidativo (Pérez-Pérez et al., 2009a). Sin embargo la más abundante y la única esencial en esta especie, como ocurre con el resto de cianobacterias, es TrxA que está relacionada con diversos procesos, por tanto su mutación tiene un efecto pleiotrópico (Mallen-Ponce, 2020). Algunas cianobacterias carecen de FTR, en estas se ha encontrado la ferredoxina flavin-tiorredoxina reductasa (FFTR) que sería la encargada de reducir a las tiorredoxinas (Balsera et al., 2013; Buey et al., 2017a). FFTR presenta un sitio de unión a FAD y se ha demostrado la capacidad de la ferredoxina reducida de reducirla, pudiendo esta proteína posteriormente reducir a las tiorredoxinas y estas a sus dianas (Buey et al., 2017a, 2021). Además, recientemente se ha demostrado que una supuesta NTR presente tanto en *Synechocystis* como en *Gloeobacter* no tiene capacidad de reducir a las tiorredoxinas e, incluso, probablemente presenta función oxidasa. Esta proteína ha sido renombrada como DDOR (Buey et al., 2017b).

4.2. Regulación enzimática mediada por glutarredoxinas.

Las Grx, por otro lado, también son proteínas globulares pequeñas ($\approx 10-15$ kDa) presentes en muchos organismos. Presentan el mismo plegamiento típico de las tioredoxinas y su centro activo puede contener dos cisteínas si son ditiólicas (CXXC) o una cisteína si son monotiólicas (CXXS) (Vlamis-Gardikas y Holmgren, 2002; Holmgren et al., 2005). Pueden reducir tanto puentes disulfuro entre cisteínas, como las tioredoxinas, como cisteínas unidas a glutatión (S-glutationilación) (Figura 6). En *Synechocystis* podemos encontrar tres glutarredoxinas: dos de ellas ditiólicas (GrxA y GrxB) y una monotiólica (GrxC). Las ditiólicas reducen puentes disulfuro como las tioredoxinas y su donador de electrones sería el glutatión que una vez oxidado será de nuevo reducido por el glutatión reductasa con gasto de NADPH. Ya que *Synechocystis* carece de glutatión reductasa no está claro quién llevaría a cabo este papel de reducción del glutatión empleado para regenerar a las glutarredoxinas (Marteyn et al., 2009). El proceso de reducción por glutarredoxinas ditiólicas es similar al de las tioredoxinas. La cisteína más próxima al extremo N-terminal ataca nucleofílicamente al puente disulfuro de la proteína diana formándose un intermediario donde ambas proteínas están unidas. Tras esto la otra cisteína de la glutarredoxina ataca al puente formado por este intermediario quedando la proteína diana reducida y la glutarredoxina oxidada. Las glutarredoxinas monotiólicas reducen puentes disulfuro entre el glutatión y su proteína diana, con lo que la proteína diana queda reducida y la glutarredoxina queda unida al glutatión, pudiendo regenerarse reduciéndose por otra molécula de glutatión y generando glutatión oxidado (Figura 6) (Zaffagnini et al., 2019). En este proceso de deglutationilación la cisteína del centro activo de la glutarredoxina ataca a la cisteína unida a glutatión de su proteína diana. Ya que este proceso solo necesita de una cisteína puede ser realizado también por una glutarredoxina ditiólica (Holmgren et al., 2005; Zaffagnini et al., 2019). A veces se ha observado que para regenerar la cisteína unida a glutatión se requiere de otra cisteína que puede ser de la misma glutarredoxina (Tamarit et al., 2003; Zaffagnini et al., 2008). La regulación por S-glutationilación es un proceso reversible y que puede estar implicado en la regulación del ciclo del carbono en cianobacterias. Así, se ha determinado como posibles dianas de esta regulación a las subunidades grande y pequeña de la RuBisCO, la fosfoglicerato quinasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (1 y 2), la aldolasa, la FBP/SBPasa, la trascetolasa, la ribulosa-5-fosfato epimerasa, la fosforribuloquinasa y CP12 en *Synechocystis* (Chardonnet et al., 2015).

5. Las actividades FBPasa y SBPasa en organismos fotosintéticos.

El ciclo CBB (Figura 4) es primordial para la fotosíntesis ya que será en él donde se realiza la fijación de carbono atmosférico para la síntesis de sus propios azúcares (Kaiser y Bassham, 1979). Por tanto este ciclo es esencial para la síntesis de esqueletos carbonados en los organismos fotoautotrófos (Pfannschmidt y Yang, 2012), y sin él la vida no existiría tal como la conocemos actualmente en la tierra (Youvan y Marrs, 1987; Buchanan et al., 2000).

Dos actividades importantes en este ciclo son la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa; EC 3.1.3.11) y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa; EC 3.1.3.37). La primera

de estas actividades enzimáticas, descrita por primera vez en 1943 (Gomori, 1943), transforma fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato y Pi mediante la hidrólisis del fosfato esterificado en el carbono 1 de su sustrato (Williams y Kantrowitz, 1992; Shieh y Chiang, 1998). Por otra parte, la segunda actividad enzimática descrita realizará el mismo proceso enzimático utilizando sedoheptulosa-1,7-bisfosfato y obteniéndose sedoheptulosa-7-fosfato y Pi (La Forge, 1920; Nordal et al., 1956). Mientras que la FBPasa participa en varias rutas metabólicas como son el ciclo CBB, la gluconeogénesis y la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Horecker et al., 1975; Wolosiuk y Buchanan, 1977; Charles y Halliwell, 1981; Pradel et al., 1981) la SBPasa únicamente está implicada en el ciclo de CBB donde es necesaria para la regeneración de RuBP. Ya que la FBPasa participa en rutas no fotosintéticas esta enzima no es exclusiva de los organismos fotosintéticos (Williams y Kantrowitz, 1992) sino que se encuentra distribuida en todos los organismos. En plantas la actividad de ambas enzimas está regulada por luz (Raines, 2003). A pesar de la similitud de sus sustratos el análisis filogenético de las enzimas de plantas demuestra que ambas enzimas tienen orígenes evolutivos diferentes, estando alejadas una de la otra (Jiang et al., 2012b; Gutle et al., 2016).

5.1. La actividad FBPasa en plantas.

En plantas existen tres enzimas con actividad FBPasa: una de ellas se encuentra en el citosol (siendo esta la actividad FBPasa que se encuentra presente en todos los tipos celulares) (Fraenkel et al., 1966; Williams y Kantrowitz, 1992; Daie, 1993; Donahue et al., 2000; Rashid et al., 2002) y dos que se encuentran en el cloroplasto de organismos fotosintéticos (Kelly et al., 1982; Serrato et al., 2009). Por su implicación en rutas importantes para el metabolismo celular la regulación de estas enzimas es esencial (Figura 7).

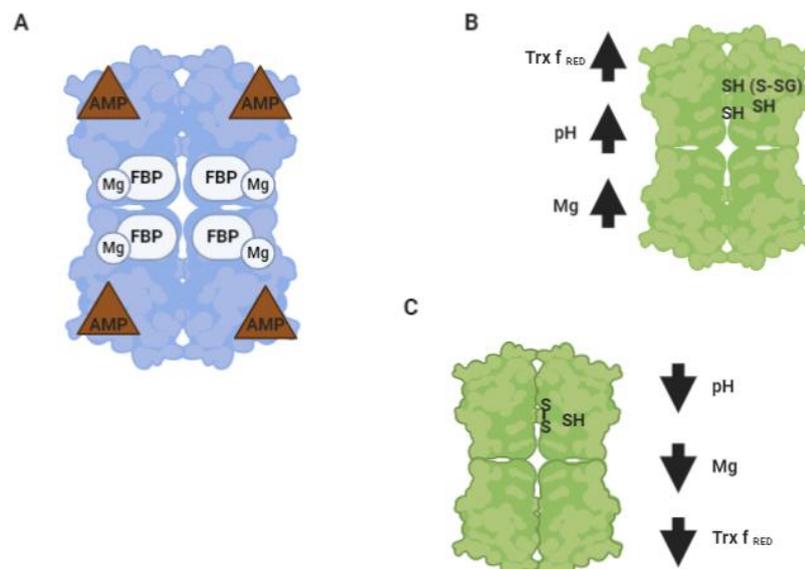


Figura 7. Regulación de la regulación de las FBPasa de plantas. (A) Esquema de la FBPasa citosólica con sus dos dominios, el catalítico de unión al sustrato y el de regulación alostérica de unión a su regulador alostérico negativo, AMP. En celeste se destacan los activadores (sustrato y cofactor) y en marrón los represores. (B) Esquema de la regulación por activación de la FBPasa cloroplastídica principal en luz. En luz el estroma se basicifica y aumenta la concentración de magnesio, además de actuar las tioredoxinas, lo que favorece su actividad. La enzima presenta

una cisteína susceptible de S-glutationilación. **(C)** Esquema de la regulación negativa de la FBPasa cloroplastídica principal en oscuridad, al estar oxidada se forma un puente disulfuro entre dos de sus cisteínas,

5.1.1. FBPasa citosólica.

La isoforma citosólica es un homotetrámero donde cada subunidad que lo conforma presenta un peso molecular alrededor de 37 kDa (Marcus et al., 1982; el-Maghrabi et al., 1993; Skalecki et al., 1999). La estructura terciaria de cada monómero presenta dos dominios, uno de unión al sustrato (dominio FBP) y otro de interacción con su regulador alostérico negativo, el AMP (dominio AMP). En cada monómero el sitio de interacción alostérica se encuentra aproximadamente a 28 Å del sitio de unión al sustrato. De forma que el dominio de interacción con AMP se encuentra en el exterior del tetrámero y el de interacción con sustrato en el centro del tetrámero (Ke et al., 1990; Villeret et al., 1995; Choe et al., 2000). Para que la enzima realice su actividad correctamente necesita la unión de cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} que se cree se unen al grupo 1-fosforilo del sustrato (Benkovic y deMaine, 1982; Tejwani, 1983; Scheffler y Fromm, 1986; Choe et al., 2000). Además presenta inhibición por interacción con fructosa-2,6-bisfosfato ya que compite con el sustrato original por su unión al centro catalítico de la enzima y se regula negativamente por litio (Figura 7A) (Van Schaftingen y Hers, 1981; Zhang et al., 1996). La forma tetramérica de esta enzima presenta dos estados diferentes, el estado R y el T, siendo el R el estado activo. Al unirse a AMP hay un cambio en la proteína que pasa de estado R al estado inactivo o T, estabilizándose esta conformación inactiva (Ke et al., 1991; Xue et al., 1994; Choe et al., 1998, 2000; Nelson et al., 2001). Por otro lado la unión del sustrato o los cationes divalentes necesarios para su correcto desempeño favorecerían el paso a un estado R o activo (Choe et al., 1998, 2000; Nelson et al., 2001). Esta enzima es insensible a regulación redox. Se ha demostrado que la disminución de su expresión provoca una bajada en los niveles de sacarosa y la capacidad fotosintética, mientras que estimula la acumulación de almidón (Strand et al., 2000), lo que relaciona esta actividad con la obtención de compuestos carbonados en organismos fotoautótrofos.

5.1.2. FBPasa cloroplastídica.

Esta enzima es un homotetrámero donde cada monómero del tetrámero tiene una masa molecular en torno a 40 kDa. La enzima presenta regulación redox dependiente de luz (Kelly et al., 1982), lo que hace que haya una relación entre el ciclo de CBB y las condiciones ambientales de luz (u oscuridad). De tal forma que mediante su reducción la enzima permanece en estado activo mientras que al oxidarse su actividad disminuye (Kobmann et al., 1994; Lee y Hahn, 2003), en su forma oxidada tiene una actividad basal de entre el 20 y el 30% de la actividad observada cuando está reducida (Gutle et al., 2016). Una de las principales características de estas enzimas en plantas es la presencia de un bucle en el que se encuentran 3 cisteínas, de las que dos de ellas son capaces de formar un puente disulfuro intramolecular. Estos residuos serán los que participan en la regulación del estado redox celular para activar o disminuir la actividad enzimática (Chiadmi et al., 1999; Lee y Hahn, 2003). Aunque este puente disulfuro está a más de 20 Å del sitio activo de la enzima, al oxidarse las cisteínas se forma un lazo que dificulta la entrada

de Mg^{2+} a su sitio de unión, cofactor que se requiere para la catálisis enzimática. Sin embargo, la regulación de esta enzima es más compleja e incluye otras modificaciones, cambios de la concentración de metabolitos en el estroma del cloroplasto y regulación por interacción con otras proteínas. Esta enzima, a diferencia de la forma citosólica no es regulable por AMP.

El paso de luz a oscuridad y viceversa provoca cambios en el estroma del cloroplasto, lugar donde se encuentra esta enzima. Durante el día al estar funcional la cadena de transporte electrónico cloroplastídica se produce un bombeo de protones al lumen tilacoidal, de forma que el pH en el estroma aumenta de 7, en oscuridad, a 8, en condiciones luminosas. Por otro lado, este bombeo de protones conlleva un aumento en la concentración de Mg^{2+} en el estroma para mantener el equilibrio de cargas positivas. Este catión es un cofactor de la enzima y en condiciones luminosas la concentración aumenta de 2 mM a 5 mM aproximadamente (Huber, 1978; Kaiser y Bassham, 1979). Además, en presencia de luz se produce la activación por reducción mediada por el sistema FTR-Trx. La FBPasa cloroplastídica es una de las dianas de las tiorredoxinas, principalmente de las tiorredoxinas *f* en plantas (Raines, 2003; Yoshida et al., 2015; Gutle et al., 2016; Naranjo et al., 2016; Fernández-Trijueque et al., 2019). *In vitro* es también susceptible de activación por Trx *m* pero en ningún caso por Trx *x* (Gutle et al., 2016; Ojeda et al., 2018a). Además se ha determinado que tiorredoxinas tipo *m* de cianobacterias serían capaces de reducir a esta proteína (Wagner y Follmann, 1978). Por último, se ha demostrado *in vitro* que esta proteína puede sufrir la S-nitrosilación de una de sus cisteínas implicadas en la formación del puente disulfuro cuando está reducida, afectando a la capacidad catalítica de la enzima en condiciones de luz (Serrato et al., 2018). Se cree que, en condiciones de oscuridad, las peroxirredoxinas actuarían oxidando a las tiorredoxinas, que podrían obtener su poder reductor de nuevo de las proteínas que en luz eran sus dianas, lo que desencadenaría la pérdida de su estado reducido en oscuridad (Ojeda et al., 2018b).

Recientemente se ha demostrado la existencia de una FBPasa cloroplastídica distinta a la canónica. El grado de similitud con las otras dos isoformas es menor al 50% y carece del bucle de cisteínas presente en el resto de FBPasas cloroplastídicas. Esta enzima presenta actividad FBPasa y se encuentra en el estroma del cloroplasto (solo de plantas superiores), aunque no presenta regulación redox ya que su actividad no varía en presencia de agentes oxidantes como H_2O_2 o reductores como el DTT (Serrato et al., 2009).

5.2. La actividad SBPasa en plantas.

La SBPasa cloroplastídica es una proteína estromática que presenta una forma homodimérica donde cada subunidad presenta una masa molecular de 35 kDa. Esta enzima también presenta regulación redox y, a diferencia de la FBPasa, en su estado oxidado es totalmente inactiva, e igual que la FBPasa presenta un bucle con tres cisteínas cercanas siendo dos de estas las encargadas de constituir la forma oxidada inactiva, además de necesitar Mg como cofactor y tener mayor actividad a pH básico (Figura 8) (Dunford et al., 1998b, 1998a; Raines, 2003; Wang et al., 2011). Esta enzima también presenta actividad FBPasa, aunque en una proporción

aproximada de 1/100 con respecto a su actividad SBPasa. De forma que todas las SBPasas presentan cierta actividad FBPasa (Gutle et al., 2016).

En cuanto al sistema de regulación de esta enzima se ha determinado *in vivo* que puede ser regulada negativamente por S-nitrosilación al igual que la FBPasa

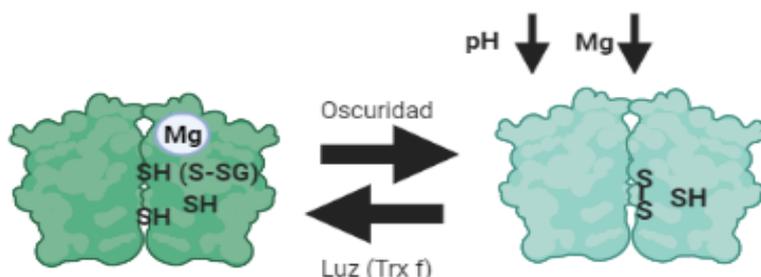


Figura 8. Regulación de la enzima SBPasa de plantas.

Esquema de la regulación por luz/oscuridad de la SBPasa cloroplastídica. En luz el estroma se basicifica y aumenta la concentración de magnesio, además de actuar las tioredoxinas, lo que favorece su actividad. La enzima presenta una cisteína susceptible de S-glutationilación. El cofactor de la enzima se representa en celeste.

cloroplastídica (Hu et al., 2015). Además se ha demostrado *in vitro e in vivo* la regulación de esta proteína fundamentalmente por la Trx *f* de plantas y en menor medida por la Trx *m* (Yoshida et al., 2015; Gutle et al., 2016). Por tanto la regulación de esta enzima también estaría sujeta a las condiciones lumínicas

ambientales como en el caso anterior (Figura 8). Se ha demostrado que la disminución de su expresión genera una bajada en los niveles de sacarosa y almidón así como de la capacidad fotosintética (Strand et al., 2000; Lawson et al., 2006), mientras que su sobreexpresión aumenta el rendimiento de los cultivos y su capacidad fotosintética (Lefebvre et al., 2005; Driever et al., 2017).

5.3. Las actividades FBPasa y SBPasa en cianobacterias.

A diferencia de lo que ocurre en plantas superiores donde hay dos enzimas cloroplastídicas, una con cada actividad, en cianobacterias las actividades fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa están catalizadas por una única enzima. Sin embargo, algunas cianobacterias también presentan una segunda proteína con actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa exclusivamente (Udvardy et al., 1982; Tamoi et al., 1998). *Synechocystis* presenta ambas isoformas de la FBPasa, una enzima FBP/SBPasa codificada por el gen *slr2094* y una FBPasa codificada por el gen *slr0952*. Generalmente las cianobacterias que presentan ambas enzimas, como *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Plectonema boryanum* tienen una alta expresión de la enzima bifuncional (FBP/SBPasa) y una baja expresión de la enzima simple (FBPasa) (Tamoi et al., 1998; Guo et al., 2014). Sin embargo, hay algunas cianobacterias que cuentan con una expresión similar de ambas enzimas como son *Synechococcus leopoliensis* (Gerbling et al., 1985) y *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tamoi et al., 1996). Puesto que en ninguna cianobacteria es posible encontrar una proteína con actividad SBPasa exclusivamente será la enzima dual quien realice esta actividad en el ciclo de CBB.

5.3.1. La enzima FBPasa en *Synechocystis*.

Esta proteína muestra similitud con las FBPasa eucariota citosólica (Tamoi et al., 1996). La enzima es un homotetrámero donde cada subunidad tiene una masa molecular de 38 kDa (Tamoi et al., 1996). La máxima actividad FBPasa de esta

enzima con respecto a la enzima dual se estima que es del 50% (Tamoi et al., 1996). Se determinó que su sobreexpresión en cloroplastos provocaba un aumento en el crecimiento y en la fijación de carbono de las plantas, tal como ocurre con la sobreexpresión de la FBPasa cloroplastídica (Tamoi et al., 2006). Sin embargo esta proteína no presenta regulación por AMP (Tamoi et al., 1996).

Estudios realizados con esta enzima han determinado que presenta regulación redox, pero contraria a la descrita para la FBPasa cloroplastídica. La actividad de esta proteína al reducirse disminuye mientras que al oxidarse aumenta (Gómez Romero, 2015). Esta enzima cuenta con tres cisteínas cercanas entre sí en las posiciones 102, 109 y 119 y necesita magnesio como cofactor, lo que demuestra similitud con la FBPasa cloroplastídica. De estos tres residuos dos son los encargados de formar un puente disulfuro (Figura 9) (Gómez Romero, 2015). La regulación *in vivo* de esta proteína, sin embargo, no ha sido objeto de estudio.

5.3.2. La enzima FBP/SBPasa en *Synechocystis*.

Esta proteína es un homotetrámero donde cada uno de los monómeros que la componen tiene un peso molecular de 35 kD, por lo que tiene un peso molecular ligeramente inferior a la FBPasa (Tamoi et al., 1996). Estudios iniciales determinaron que esta enzima presentaba regulación redox pero posteriormente otros análisis realizados señalarían que carecía de esta regulación ya que no era sensible a bajas cantidades de H₂O₂ como sí ocurre con la FBPasa cloroplastídica (Gerbling et al., 1986; Tamoi et al., 1996). Sin embargo posteriormente se determinó que no solo era sensible a oxidación sino que presenta la regulación redox característica de las enzimas implicadas en el ciclo de CBB, de forma que al reducirse por un reductor exógeno como el DTT se activa y al oxidarse disminuye su actividad (Miyagawa et al., 2001; García-Cañas, 2015). Además también presenta una inhibición de su actividad debida a bajas concentraciones de AMP, que actuaría como un inhibidor alostérico negativo de la enzima (Daie, 1993; Tamoi et al., 1996, 1998; Feng et al., 2013). Esta proteína es activada por Mg²⁺ y Mn²⁺, ya que estos cationes actúan como cofactores de la enzima (Figura 9) (Sun et al., 2012).

Estructuralmente muestra gran similitud con la FBPasa citosólica ya que en ella podemos distinguir los mismos dos dominios que en la de organismos eucariotas: presenta un dominio de unión a sustrato, que a diferencia del de la enzima citosólica no se encuentra en la interfase entre los monómeros sino en la parte exterior, y uno de unión a su regulador alostérico, el AMP. Este último dominio se encuentra en el centro de tetrámero, algo que también difiere al de la FBPasa citosólica. De forma que su similitud se debe más a la conformación similar que a la localización de las estructuras importantes en la misma (Feng et al., 2013). Se cree que esta proteína también presenta dos estados, uno R o activo y uno T o inactivo. Del mismo modo que en la FBPasa citosólica el AMP es capaz de unirse a su estado tetramérico inactivo o dimérico inactivo (ya que se cree que su formación se debe a la unión de dos homodímeros iguales) y estabilizarlo, consiguiendo por tanto una disminución de su actividad enzimática. Serán las condiciones reductoras y la presencia de Mg (o Mn) quienes favorecerán la adopción del estado R o tetramérico activo (Figura 9) (Feng et al., 2013). Dependiendo de su estado redox, es decir de si se encuentra oxidada o reducida, se formarán unos u otros oligómeros debido a las diferentes

conformaciones que puede adoptar, pudiendo presentarse en forma dimérica y tetramérica (Gerbling et al., 1985; García-Cañas, 2015).

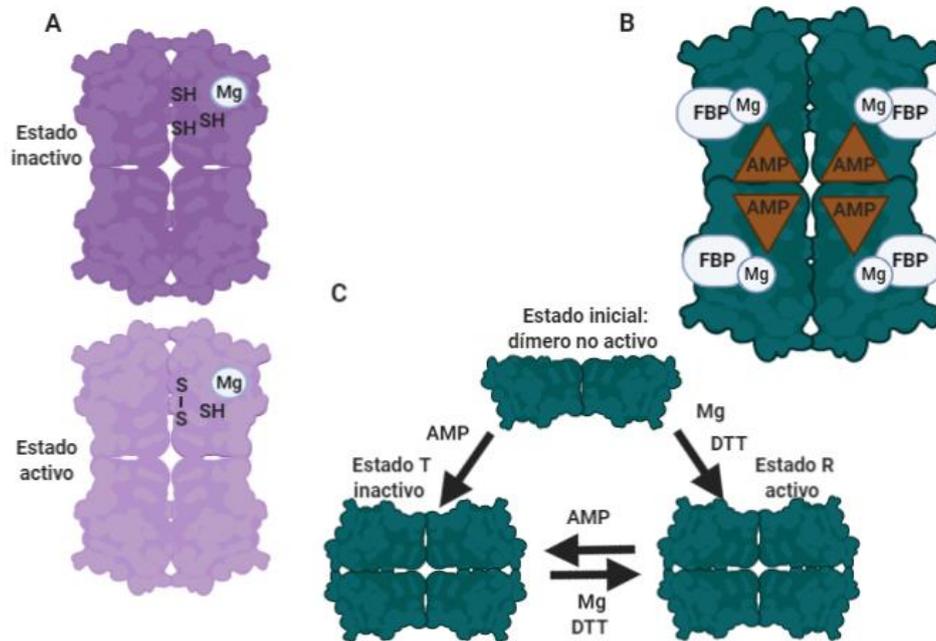


Figura 9. Regulación y estructura de las enzimas FBPasa y FBP/SBPasa de *Synechocystis*. (A) Regulación del homotetrámero FBPasa de cianobacteria por oxidación-reducción. La enzima presenta 3 cisteínas y el puente disulfuro entre dos de ellas permite el paso a estado activo. El cofactor de la enzima aparece representado en celeste. (B) Esquema de la FBP/SBPasa de cianobacteria. La enzima presenta sitios de unión a fructosa-1,6-bisfosfato y AMP. El cofactor de la enzima aparece representado en celeste. (C) Regulación de la FBP/SBPasa de cianobacteria. Se cree que la interacción de FBP/SBPasa con AMP, DTT y Mg^{2+} provoca cambios estructurales que provocan cambios en la actividad de la misma.

En relación a los residuos implicados en su regulación redox hay discrepancias entre unos grupos y otros. Esto se debe a que, a diferencia de las enzimas de plantas o la otra FBPasa cianobacteriana donde el número de cisteínas es limitado, esta enzima presenta un número mayor de cisteínas. Por un lado el grupo de investigación que determinó su estructura por cristalografía realizó los mutantes puntuales de las diferentes cisteínas y determinó que serían, en *Synechocystis*, los residuos C75 y C99 los implicados en la formación del puente disulfuro que estabiliza la conformación inactiva (Feng et al., 2013). Sin embargo, posteriormente se analizó la distancia, en la estructura, entre uno y otro residuo. De esta forma se determinó que estas dos cisteínas, en la estructura inactiva, estarían lejos una con respecto a la otra, por lo que proponen a los residuos C75 y C84 como aquellos cercanos entre sí (Cotton et al., 2015). Estudios preliminares sobre estas cisteínas determinaron que la sustitución C75S o C84S no producía una activación constante de la enzima (García-Cañas, 2016). Por tanto, el puente disulfuro no podría solo deberse a una interacción C75-C84 o C75-C99. Por otro lado, estudios proteómicos *in vivo* apuntan a que las cisteínas implicadas serían los residuos C75 y C235 (Guo et al., 2014). Además, estudios realizados en *Synechococcus* sp. PCC 6301 sugerían que las tiorredoxinas podían reducir a esta proteína (Schmidt, 1981).

Esta proteína es esencial para el crecimiento fotoautotrófico, su eliminación impide el crecimiento en condiciones distintas a la mixotrofia o fotoheterotrofia (Yan y Xu,

2008; García-Cañas, 2015). La expresión de esta enzima dual en plantas dio lugar a un aumento en la producción y crecimiento de las mismas, incrementándose su capacidad fotosintética y de asimilación de CO₂ (Miyagawa et al., 2001; Ogawa et al., 2015). Por otro lado la sobreexpresión de la enzima dual en diferentes estirpes de cianobacterias genera organismos con una mejora de la capacidad fotosintética (García-Cañas, 2016; Porcellinis et al., 2018). Lo que pone de manifiesto su importancia en el metabolismo fotosintético.

Estudios filogenéticos han determinado que esta proteína deriva de una FBPasa anterior a las actuales de plantas, que también dio lugar a estas. Se cree que esta FBPasa anterior, ante la necesidad de una actividad SBPasa para fijar carbono al surgir el ciclo de CBB, adquirió una mutación donde su centro activo se amplió para alojar a la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (Jiang et al., 2012b; Gutle et al., 2016). Por lo que, aunque la cianobacteria que dio origen a los cloroplastos presumiblemente era capaz de fijar carbono, la FBP/SBPasa fue sustituida en plantas por 2 proteínas de actividades SBPasa y FBPasa. De forma que la separación de estas dos actividades en enzimas distintas debe suponer alguna ventaja selectiva en plantas.

6. Regulación génica en cianobacteria.

Para conseguir que las proteínas y genes se sinteticen y expresen cuando las condiciones ambientales lo requieran las bacterias presentan diferentes niveles de regulación. Esta regulación puede observarse a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional o postraduccional con la degradación de proteínas.

6.1. Regulación transcripcional.

Tradicionalmente los elementos dianas de la expresión génica son los promotores. En estos elementos cianobacterias y bacterias presentan diferencias, de forma que en cianobacterias la caja -10 está muy conservada pero la región -35 no (Vijayan et al., 2011). Se cree que esto podría deberse a que la región -35 se divide en diferentes subclases que sí estarían conservadas, en lugar de una general (Vogel et al., 2003). Los promotores en cianobacterias pueden dividirse en 3 grupos en base a su secuencia de DNA. Los tipo I que contienen un elemento -10 consenso 5'-TATAAT-3' y -35 de 5'-TTGACA-3'. Los tipo II que carecen de elemento -35 pero contienen sitios de reconocimiento de activadores transcripcionales como el de *glnB* que contiene un sitio de reconocimiento de NtcA. Los tipo III que no tienen secuencias consenso para ninguno de los dos motivos y suelen pertenecer a genes de respuesta estrés y cuya expresión se estimula por la unión de los factores sigma tipo III (Camsund y Lindblad, 2014). La RNA polimerasa también es diferente en cianobacterias y bacterias. Así, en bacterias las subunidades que la componen suelen ser $\alpha_2\beta\beta'\omega$ codificadas por *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, y *rpoZ*. Mientras que en cianobacteria *rpoC* está dividido en dos subunidades, la subunidad N-terminal y (*rpoC1*) y la C-terminal β' (*rpoC2*) (Xie et al., 1989; Minakhin et al., 2001). Otra diferencia que presentan son los factores sigma, proteínas implicadas en la unión de la RNA polimerasa con los promotores para iniciar la transcripción. En bacterias podemos encontrar σ^{70} y σ^{54} a diferencia de cianobacterias donde solo se encuentran los primeros (Merrick, 1993; Imamura y Asayama, 2009). La familia de factores σ^{70} se pueden dividir en tres grupos, en relación con los promotores que

reconocen. El grupo 1, formado por σ^A , es el grupo principal y se encarga de la transcripción de genes a un nivel basal que se expresan de forma constante. El grupo 2 que son factores sigma no esenciales y que responden a estímulos ambientales como σ^D , σ^C , σ^B o σ^E . El grupo 3 presentan una estructura alternativa y también responden a estrés siendo σ^F , σ^H , σ^G o σ^I .

De forma general los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, dependiendo de si el gen cuya expresión controlan siempre se expresa o su expresión cambia en respuesta a un estímulo. Dependiendo del promotor la expresión del gen puede ser más o menos fuerte, puede tener una expresión basal que aumente en una determinada circunstancia y puede variar el rango dinámico (solo en el caso de ser inducible) (Marin et al., 2004; Zavřel et al., 2017). Existen promotores constitutivos con diferentes niveles de expresión en cianobacteria, así *PcpcB* o *PpsbA*, que codifican para la cadena β de la ficocianina y el gen que da lugar a la proteína D1 del fotosistema II respectivamente (Johnson et al., 1988; Mohamed y Jansson, 1989), son promotores fuertes. Existen promotores inducibles que responden a estímulos tan diversos como la intensidad luminosa (Lindberg et al., 2010), diferentes metales (cobre, níquel, hierro, arsénico, zinc...) (Rutherford et al., 1999; García-Domínguez et al., 2000a; López-Maury et al., 2002, 2003; Foster et al., 2012; Giner-Lamia et al., 2014) o cambios nutricionales (carbono, azufre, hierro, nitrógeno...) (Herrero et al., 2001; Omata et al., 2001; Wang et al., 2004; Flores et al., 2005; Woodger et al., 2007; Ishii y Hihara, 2008; Nishimura et al., 2008; Daley et al., 2012). Generalmente estos promotores se encuentran bajo el control de factores transcripcionales específicos.

Ejemplos de este tipo de regulación es la respuesta a metales como el níquel o el arsénico en el medio. Respecto a la regulación por níquel en presencia del metal el regulador transcripcional NrsR (regulador de la familia PhoB/OmpR) actúa sobre *nrsBACD* que codifican para los transportadores de este metal al periplasma o al exterior celular, además de actuar sobre *nrsRS* activándose a sí mismo. NrsS es una histidina quinasa con un dominio periplásmico que es capaz de detectar el Ni^{2+} y fosforilar a NrsR permitiéndole pasar a un estado activo, actuando entonces como un activador de la transcripción. *nrsD* además presenta otro nivel de regulación mediante un promotor interno previo a él en el operón. Este promotor está regulado por InrS, un factor de transcripción de la familia CsoR que se une a este promotor reprimiendo su expresión. Cuando hay níquel disponible este interacciona con InrS e impide la represión (García-Domínguez et al., 2000a; López-Maury et al., 2002; Foster et al., 2012; Giner-Lamia et al., 2014). La resistencia a arsénico está mediada por el operón *arsBHC*, que incluye a un transportador de arsenito (*arsB*), una reductasa (*arsH*) cuya función en esta resistencia no está bien establecida y una arseniato reductasa (*arsC*). Este operón está regulado por ArsR, siendo este un represor del mismo. Por tanto cuando hay arsenito en el citoplasma este se une a ArsR permitiendo que el represor no actúe sobre el promotor de estos genes y por tanto favoreciendo su expresión y la resistencia al metal (López-Maury et al., 2003).

En cuanto a la regulación transcripcional por los niveles de nutrientes destaca la respuesta a cambio en la disponibilidad de nitrógeno mediada por NtcA, un regulador de la familia CRP muy conservado en las cianobacterias que incluso controla la fijación de nitrógeno en cianobacterias diazotróficas mediante la unión como un dímero a su secuencia consenso GTAN₈TAC del promotor de sus genes diana

(Vega-Palas et al., 1992; Herrero et al., 2001). Cuando no hay nitrógeno en el medio NtcA actúa como un represor y como un activador. Reprime a, entre otros, *gifA* y *gifB* que codifican para los factores inactivantes de la glutamina sintetasa IF7 e IF17 (García-Domínguez et al., 2000b) y como activador en genes como *glnA*, *glnB* y *ntcB* (Muro-Pastor et al., 2005). Además, en estas condiciones el 2-oxoglutarato favorece la unión al DNA; en la regulación por NtcA además intervienen otras proteínas como son P_{II} y PipX (Forcada-Nadal et al., 2018).

6.2. Regulación post-transcripcional.

La regulación a nivel post-transcripcional puede deberse a cambios a nivel de la traducción del RNA_m, cambios en su estabilidad o cambios a nivel de proteína.

6.2.1. Regulación por riboswitches.

Son elementos reguladores en cis del RNA_m que generalmente se localiza en la 5' región que no se traduce (UTR). En respuesta a determinados metabolitos o moléculas señal se genera un cambio conformacional que hacen que haya un intercambio entre una forma ON y OFF de la traducción de este RNA. El aptámero de los riboswitches es la parte que se une al ligando mientras que la plataforma de expresión es la que interacciona con la maquinaria de expresión (Garst et al., 2011). La regulación puede realizarse a nivel de traducción alterando el sitio de unión con el ribosoma, aunque también pueden realizarlo bloqueando o permitiendo la formación de una horquilla en el terminador.

6.2.2. Regulación por RNAs.

La regulación por RNA pequeño está muy extendida en cianobacterias y participa en muchos procesos de gran importancia. Un ejemplo de esto es la aclimatación a deficiencia de hierro en cianobacteria mediante la regulación de *isiA* por el RNA no codificante IsrR. IsrR se transcribe de forma constitutiva y se acumula en todas las condiciones excepto ante bajo hierro. De forma que cuando este RNA está presente se une por una zona de complementariedad con *isiA* y ambos se degradan, impidiendo por tanto su traducción (Dühning et al., 2006). IsiA es una proteína inducida por estrés asociado a bajo hierro, alta luz o estrés redox cuya expresión sufre regulación por otros RNAs. Ambos RNA presentan otros niveles de regulación como su expresión regulada por RpaB con resultado opuesto en uno y otro (activador en *isiA* y represor en *isrR*). Además *isiA* está bajo el control de un regulador transcripcional, Fur, el cual reprime la expresión de este RNA cuando las concentraciones de hierro son altas permitiendo que se acumule en altas cantidades en condiciones de falta de hierro (Krynicka et al., 2019). De forma que los RNA_{nc} pueden, como en el ejemplo descrito, regular procesos muy diferentes mediante efectos en la transcripción y a su vez estar regulados por otros procesos ya señalados.

7. Regulación por proteólisis en bacterias.

La regulación por proteólisis es un mecanismo extendido en bacterias, que controla la respuesta a estrés o la esporulación, entre otros procesos. El principal regulador transcripcional en respuesta a estrés en bacteria es el factor sigma RpoS (σ^S). Sus niveles son bajos pero, antes diferentes tipos de estrés, su transcripción, traducción y proteólisis se ven alteradas (Lange y Hengge-Aronis, 1994). Así en respuesta a bajo carbono, nitrógeno, fósforo, bajos niveles de aminoácidos, hiperosmolaridad, bajada del pH o altas temperaturas se inhibe su degradación por proteólisis (Hengge-Aronis, 2002). La degradación de este factor depende principalmente de una proteasa ATP-dependiente, ClpXP, y de RssB que lo marca como diana para la proteasa. RssB es un regulador cuya forma fosforilada tiene gran afinidad por RpoS (Schweder et al., 1996; Becker et al., 1999; Klauck et al., 2001), una vez unido a esta proteína RpoS es reconocido por ClpXP y se degrada. Tras transferir RpoS a ClpXP RssB se libera del complejo. El reconocimiento de RpoS por ClpXP solo es posible cuando previamente se ha unido a RssB. El cambio en la degradación de RpoS está controlado, además, por IraP que impide la correcta unión con RssB y la fosforilación de RssB, en condiciones de falta de nutrientes (Hengge, 2008).

Otro ejemplo es el factor transcripcional ComK de *Bacillus subtilis* relacionado con la esporulación que presenta una regulación postranscripcional relacionada con la proteólisis. En esta intervienen MecA, ClpC y ComS. Al unirse MecA a ComK y ClpC, se formará una estructura que favorecerá la degradación de ComK por la proteasa ClpCP (Turgay et al., 1997, 1998; Persuh et al., 1999). ComS es capaz de unirse a MecA por el mismo dominio por el que ComK se une a este, desplazar por tanto la unión y degradación de ComK. Cuando hay una alta densidad de células aumentan los niveles de ComS y esto desplaza la unión de MecA con ComK, protegiéndolo de la proteólisis (Turgay et al., 1997, 1998; Persuh et al., 1999). Por tanto, la proteólisis en bacterias es un mecanismo extendido para controlar la expresión de genes o procesos regulatorios.

7.1. Regulación por proteasas tipo M48 y reguladores transcripcionales BlaI/MecI en bacterias.

Estos mecanismos de regulación controlan, entre otros procesos, la expresión de genes de resistencia a diferentes antibióticos en bacterias. Dando lugar, por tanto, a la adaptación de estas a los mismos y a la generación de bacterias resistentes. Así las proteasas tipo M48, BlaR1 y MecR1, actúan conjuntamente con los reguladores transcripcionales BlaI y MecI para regular la expresión de *blaZ* y *mecA* respectivamente (Carretto et al., 2002; Llarrull et al., 2011). Siendo estos dos últimos genes los encargados de conferir resistencia a penicilina y meticilina respectivamente. Estos genes codifican para la PC1 β -lactamasa y la transpeptidasa PBP2A, que generan resistencia a β -lactámicos. En este sistema de regulación las proteasas actúan como sensores de los diferentes antibióticos, generando una serie de cambios que las activan y actúan sobre sus dianas, los reguladores transcripcionales. Estos reguladores actúan como represores de los genes de resistencia y de ellos mismos, además son intercambiables ya que se unen a la misma secuencia de DNA (Lewis y Dyke, 2000; Carretto et al., 2002; Llarrull et al., 2011).

Adicionalmente, BlaI participa en la respuesta a catelicidina de *Staphylococcus aureus*, aunque se desconoce la cascada regulatoria que lo permite. Se cree que podría ser mediante la represión de un represor de la respuesta a catelicidina o activándola él mismo (Pence et al., 2015). En cuanto a la función de MecR1 sobre MecI realmente no hay ninguna evidencia directa que determine que la proteasa es capaz de actuar sobre este regulador transcripcional, aunque si existen evidencias indirectas y es lo que está predicho. En la regulación del operon *mec* también participa MecR2 que mediante su unión con MecI favorece que este sea degradado por proteasas citoplásmicas y por tanto que se exprese el gen de resistencia (Figura 10) (Arêde et al., 2012).

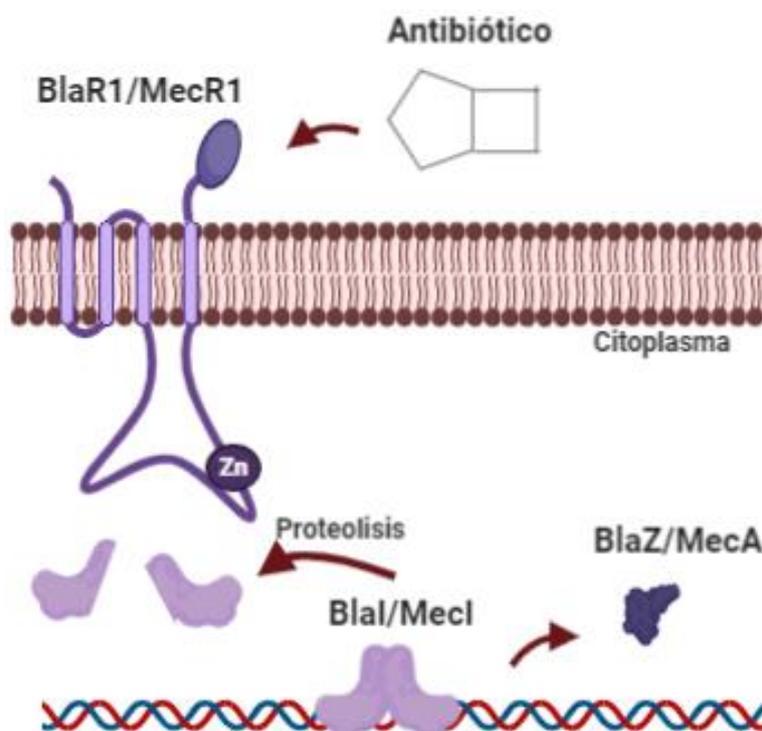


Figura 10. Esquema de la regulación por las proteasas BlaR1 y MecR1 (tipo M48) sobre los reguladores transcripcionales BlaI y MecI. Las metaloproteasas dependientes de zinc ante la presencia de determinados antibióticos se activan provocando la degradación

7.1.1. Regulación mediada por proteasas tipo M48.

Las metaloproteasas MecR1 y BlaR1 son proteínas transmembrana que cuentan con 4 segmentos transmembrana y un segmento N-terminal extracelular. Ambas proteínas presentan un dominio metaloproteasa N-terminal que comprende los primeros 338 aminoácidos y un dominio C-terminal, a partir del residuo 339, encargado de detectar el antibiótico a través de una estructura periplásmica (Golemi-Kotra et al., 2003; Cha et al., 2007). Además, estas proteínas presentan en el segmento citosólico (en el que se encuentra el centro activo de las proteasas) que une el tercer y cuarto segmento transmembrana. Este dominio contiene el motivo HEXXH (Rawlings y Barrett, 1995), se cree que son estas dos histidinas las encargadas de coordinar con un átomo Zn^{2+} , dado que estas proteasas son dependientes de Zn (Zhang et al., 2001). Los estudios realizados en BlaR1 de *Bacillus licheniformis* han identificado que el residuo de ácido glutámico conservado en este motivo también está implicado en la coordinación con el átomo de Zn

(Berzigotti et al., 2012). La activación de estas proteasas mediante su interacción con el antibiótico todavía es motivo de estudio. Inicialmente se creía que la unión del antibiótico generaría la acilación de un residuo de serina de su dominio sensor y esto induciría una reestructuración que activaría su capacidad catalítica sobre Mecl/Blal. Sin embargo, el cambio no solo se debe a la acilación de dichos residuos, sino que el dominio sensor en ausencia de antibiótico interacciona con el componente L2, constituido por el segmento extracelular que une los segmentos transmembrana 2 y 3. Por tanto el antibiótico, cuando está presente, compite con L2 por unirse al dominio sensor y, puesto que la afinidad por el antibiótico es mayor, el dominio sensor se separa de L2. Esto origina una reestructuración conformacional que da lugar al estado activo (Hanique et al., 2004; Marrero et al., 2006; Straude et al., 2015; Mescola et al., 2019).

Se ha demostrado que BlaR1 presenta capacidad autocatalítica, independiente de que se una o no al antibiótico, esta capacidad le permite cortarse a sí misma en el segmento citosólico que une el tercer y cuarto segmento transmembrana. Además de permitir que actúe sobre su proteína diana de forma independiente a la presencia del antibiótico activador. Esta actividad depende de su unión a Zn y es independiente de cualquier otra proteína bacteriana, aunque se especula que podría existir otra proteína implicada en este sistema para hacer que la capacidad proteolítica de BlaR1 aumente en presencia del antibiótico. Se cree que es el residuo de ácido glutámico, quien coordina junto a las histidinas con el átomo de zinc, el encargado de realizar este autocorte. De forma general existe un 10% de expresión del operón *bla* aun sin la presencia de antibiótico, por lo que se cree que esta capacidad autocatalítica también podría estar implicada en el mantenimiento de un equilibrio entre la síntesis de BlaR1 y su degradación, de forma que aun sin estar activada se autocorte para su degradación permitiendo así la entrada en la membrana de BlaR1 recién sintetizada (Llarrull et al., 2011; Llarrull y Mobashery, 2012). MecR1, a diferencia de BlaR1, no solo presenta 4 segmentos transmembrana, sino que entre el tercero y el cuarto segmento presenta una hélice reentrante con un pequeño segmento asociado a la membrana plasmática. Los extremos que unen a esta hélice con el tercer y cuarto segmento transmembrana son citosólicos. Sería esta hélice donde se encontraría el dominio gluzincina, que incluye al motivo HEXXH, encargado de su actividad metaloproteasa. También para esta proteasa se cree que sería el residuo de ácido glutámico el encargado de promover el autocorte de la misma (Belluzo et al., 2019). En cualquier caso, el sitio de corte autocatalítico de esta proteína y el de BlaR1 lo constituiría la misma secuencia consenso conservada BLysArg/Glu(-)ArgBXXB (donde B se refiere a cualquier residuo hidrofóbico voluminoso) (García-Castellanos et al., 2003).

Otra proteasa de la misma familia es la proteasa HtpX de *E.coli* que está implicada en la eliminación de proteínas mal plegadas citosólicas que puedan afectar al correcto funcionamiento de la célula (Sakoh et al., 2005). Se ha demostrado *in vivo* que la proteína está implicada en la resistencia a estrés térmico mediante su actividad proteasa (Shimohata et al., 2002; Sakoh et al., 2005; Yoshitani et al., 2019). Al igual que las dos metaloproteasas anteriores esta proteína también presenta 4 dominios transmembrana, los residuos conservados de interacción con Zn y es capaz de catalizar su propio corte. Esta capacidad autocatalítica genera cortes entre los residuos Leu-260-Cys-261 y Cys-261-Ile-262 en el dominio citosólico posterior a la cuarta hélice transmembrana (Sakoh et al., 2005; Yoshitani

et al., 2019). Esta proteína de *Leptospira interrogans* se ha demostrado que está implicada en la respuesta a estrés de la membrana en condiciones de exceso de hierro en el medio, de forma que su eliminación da lugar a una alteración en la respuesta a estrés y la acumulación del hierro exterior en esta bacteria (Henry et al., 2013).

7.1.2. Regulación mediada por reguladores Blal/MecI

Blal y MecI se cree que actúan de la misma forma, reprimiendo la expresión de *blaZ* y *mecA* a la vez que reprimen su propia expresión y la de las proteasas que los degradan (Lewis y Dyke, 2000; Safo et al., 2005; Pence et al., 2015). Tanto Blal como MecI se unen como un dímero a estas regiones para actuar como represores. Estos represores presentan dos dominios, el N-terminal donde se encuentra la secuencia de reconocimiento del DNA y el C-terminal por donde se produce la dimerización de sus dos subunidades. Cada una de sus regiones de reconocimiento del DNA se une al palíndromo 5'-TACANXXTGTA-3'. En ambos casos actúan dos dímeros de cada represor ya que en ambos casos los operones presentan dos veces estas secuencias. En el caso de MecI cada uno de estos dímeros se unirá por un lado distinto de la hebra, ya que entre ambas secuencias de reconocimiento no hay espaciado suficiente, mientras que en el caso de Blal la unión de ambos dímeros ocurrirá en el mismo lado de la doble hebra, ya que si cuenta con suficiente distancia entre uno y otro sitio de reconocimiento. Se cree que la unión del primer dímero facilitaría la unión del segundo (García-Castellanos et al., 2003; Safo et al., 2005, 2006). Los estudios de ambos represores unidos al DNA y libres demuestran que el sitio de proteólisis, que se encuentra en el dominio C-terminal, es más accesible al estar los represores unidos al DNA. Por lo que posiblemente la proteólisis ocurra cuando están actuando como represores (Safo et al., 2005). El corte de MecI tiene lugar en el dominio de dimerización (C-terminal) entre Asn101 y Phe102, siendo el sitio consenso de corte tanto para este como para Blal: BOOAsn(-)PheOGlu/LysXXXO (donde O se refiere a cualquier residuo apolar) (García-Castellanos et al., 2003). Una segunda señal de inactivación, más allá de la proteólisis del dímero, se generará por dipéptidos de la pared celular producidos por las alteraciones en la misma ante la unión de β -lactámicos. Así γ -D-Glu-L-Lys derivado del peptidoglucano de *Staphylococcus aureus* se une al dominio C-terminal de MecI dificultando su unión con el DNA y favoreciendo su degradación. Aunque no está claro cómo se generan estos peptidoglucanos o si son derivados de la actividad proteasa de BlaR1 y MecR1 (Amoroso et al., 2012). Se ha demostrado que la expresión del locus *bla* en aquellas estirpes de bacterias resistentes a β -lactámicos por la expresión del operon *mec* es capaz de hacer que se formen heterodímeros Blal-MecI con menor capacidad reguladora (Arède et al., 2013). No se ha determinado si esto se debe a que tiene menor afinidad con las secuencias diana del DNA o es que se favorece la proteólisis de los heterodímeros.

Dentro de esta familia de reguladores transcripcionales también están presentes los reguladores CopY de bacterias Gram + (Liu et al., 2008; Solioz et al., 2010), un represor relacionado con la resistencia a cobre. CopY presenta un dominio C-terminal de unión a metal y un dominio N-terminal de unión a DNA (Solioz y Stoyanov, 2003). Cuando la concentración de cobre es baja CopY coordina un ion de zinc y actúa como un represor transcripcional al unirse a la secuencia TACA-N₂-

TGTA del promotor del operón. Sin embargo cuando la concentración de cobre es elevada coordina con dos átomos de este y pierde su afinidad con el DNA (Portmann et al., 2006). En *Streptococcus faecalis* el regulador está codificado en el operón *copYZAB*, que además incluye a la chaperona de cobre CopZ y dos transportadores de cobre al exterior con gasto de ATP, CopA y CopB (Odermatt y Solioz, 1995; Argüello et al., 2011). CopZ al unir cobre interacciona con CopY transfiriéndole dicho cobre, de forma que ya no es capaz de reprimir la expresión del operón (Cobine et al., 1999). Este mecanismo de regulación también está presente en otras bacterias como *Streptococcus pneumoniae* (Shafeeq et al., 2011).

8. Metabolismo de hierro y cobre, dos metales esenciales para la fotosíntesis en cianobacterias.

Tanto el hierro como el cobre participan en rutas esenciales del metabolismo como son la fotosíntesis y la respiración, aunque una alta concentración de los mismos da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por tanto generan daño oxidativo y dañan a la célula (Halliwell y Gutteridge, 1984). Por lo que las células presentan mecanismos para asegurar la correcta homeostasis: percepción de los metales, secuestro y transporte de los mismos (Tottey et al., 2005). La maquinaria fotosintética contiene un elevado número de proteínas que requieren hierro (centros sulfoferricos y grupos hemo) o cobre como cofactor (Hervás et al., 2003), por lo que el requerimiento de ambos metales en organismos fotosintéticos es mayor que el de organismos no fotosintéticos (Shcolnick y Keren, 2006).

8.1. Metabolismo y homeostasis del hierro.

El hierro es un metal que está presente en muchas proteínas como un grupo hemo, centros sulfoferricos o simplemente como cofactor. La capacidad de pasar de Fe^{2+} a Fe^{3+} y viceversa, dependiendo de su estado de oxidación, es lo que favorece que este elemento actúe como un cofactor en procesos de transferencia electrónica. Sin embargo el hierro participa también en procesos negativos como la creación de ROS mediante la reacción de Fenton (Latunde-Dada, 2017). El aparato fotosintético está formado por varios supercomplejos de membrana donde el hierro es un cofactor, además de ser necesario para la asimilación de N_2 por lo que las cianobacterias fijadoras de nitrógeno presentan una demanda de hierro superior (Morel et al., 1991). Por lo que la homeostasis del hierro en cianobacterias está coordinada con la respuesta a estrés oxidativo y el metabolismo del nitrógeno; en esta red el regulador transcripcional FurA juega un papel decisivo (Botello-Morte et al., 2013; Fillat, 2014; González et al., 2014, 2016a). Varias enzimas del metabolismo del nitrógeno presentan hierro en forma de centros sulfoferricos (nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamato sintasa y la nitrogenasa), esto hace que el metabolismo del hierro y del nitrógeno presenten una interconexión (González et al., 2016b).

La principal función del hierro en la fotosíntesis es mediante grupos hemo y los centros sulfoferricos de los complejos fotosintéticos. En los grupos hemo de los citocromos, que tienen una función de transferencia de electrones, generalmente el hierro se encuentra coordinado con dos histidinas o una histidina y una metionina. En el caso de los centros sulfoferricos el hierro suele estar coordinado con ligandos

cisteinilo de la proteína, aunque puede presentar otros ligandos como histidinas en los centros tipo Rieske. Estos centros suelen encontrarse en forma Fe_2S_2 o Fe_4S_4 (González et al., 2016b). Ambos cofactores están presentes en las proteínas y complejos que participan en la fotosíntesis cianobacteriana como el PSII, el PSI, el Cit c_6 , el Cit b_6f y las ferredoxinas. Entre ellos la principal acumulación de hierro está presente en el PSI donde cada trímero contiene 36 moléculas de hierro divididas en 9 centros sulfoférricos Fe_4S_4 , haciendo que más del 25 % del requerimiento de hierro en *Synechocystis* se emplee solo en este fotosistema (Keren et al., 2004).

Ya que el hierro de forma general es poco soluble en medio acuático las cianobacterias han desarrollado diferentes estrategias para captarlo como la expresión de sideróforos, varios sistemas de transporte y mecanismos de incorporación y almacenamiento (Goldman et al., 1983; Keren et al., 2004; Shcolnick y Keren, 2006; Jeanjean et al., 2008; Nicolaisen et al., 2008; Mirus et al., 2009). La absorción de hierro en *Synechocystis* se realiza mediante porinas específicas (Slr1908) o inespecíficas y un sistema de transportadores dependientes del sistema TonB-ExbB-ExbD (Qiu et al., 2021). Además, en el espacio periplásmico esta cianobacteria presenta proteínas como FutA2 que une Fe^{3+} , manteniéndose así hierro disponible. Se cree que ante ciertas condiciones de estrés FutA2, es capaz de ser transportada al espacio extracelular, aunque no se sabe cómo (Giner-Lamia et al., 2016a). Por otra parte FutA1, otra proteína de unión a hierro, se encuentra en el interior celular presumiblemente protegiendo al PSII. El hierro del espacio periplásmico se transportará a través de la membrana plasmática mediante los complejos FutABC y FecCDE, las permeasas cFTR1 y CDF (proteína que facilita la difusión de hierro) y el transportador FeoB y su activador FeoA (Cartron et al., 2006; Jiang et al., 2012a; Kranzler et al., 2014; Xu et al., 2016; Obando et al., 2018). Esta cianobacteria a pesar de no producir sideróforos (sistemas de transporte para la captación de hierro exterior) cuenta con el mecanismo proteico implicado en la captación de los mismos del medio. Estos sideróforos unidos a hierro se transportarán por la proteína FecB que lo conducirá al complejo de transportador FecCDE. Estos genes a su vez están regulados por FurA (Jiang et al., 2015; Kaushik et al., 2018; Qiu et al., 2018)

En las cianobacterias el balance entre la adquisición del hierro y la protección frente a estrés oxidativo generado por el hierro es controlado por el regulador transcripcional FurA (Andrews et al., 2003). Generalmente FurA actúa como un represor transcripcional que percibe el hierro libre dentro de la célula y controla la expresión de genes de respuesta a disponibilidad de hierro. De forma que, cuando hay hierro disponible este se une a Fur formando un complejo que actúa sobre las cajas Fur de los promotores de los genes de captación de hierro y los reprime (Escolar et al., 1999; Hernández et al., 2002; Fillat, 2014). Sin embargo, cuando no hay hierro disponible esta estructura no se forma y el represor se mantiene inactivo, por lo que se produce la transcripción de estos genes. FurA no solo controla los genes implicados en el almacenamiento y la captación de hierro, sino que controla la expresión de un amplio espectro de genes que participan en diferentes funciones (Lin et al., 2011; Teixidó et al., 2011). En cianobacterias FurA modula, bien directa o bien indirectamente, la expresión de genes fotosintéticos (González et al., 2010, 2011, 2012, 2014), la expresión de *isiA* (proteína inducida por estrés de hierro IsiA) (Leonhardt y Straus, 1994) e *isiB* (flavodoxina) (Bes et al., 2001), la expresión de las subunidades PsaA, PsaL, PsaK y PsaZ de los fotosistemas (López-Gomollón et al.,

2007; González et al., 2014), de proteínas relacionadas con mecanismos de concentración de carbono y de la subunidad grande de la RuBisCO (López-Gomollón et al., 2007; González et al., 2011). Este regulador también controla la expresión de proteínas que participan en la biosíntesis de los anillos tetrapirrólicos, controlando así la expresión de la ferroquelatasa, protoporfirinógeno oxidasa, porfobilinógeno sintasa y porfobilinógeno deaminasa. De igual forma participa en la regulación de los grupos hemo regulando la expresión de enzimas que participan en su degradación, como la hemo oxigenasa 1 (González et al., 2012), y en la síntesis de pigmentos fotosintéticos como clorofila o ficobilinas (Vavilin y Vermaas, 2002). Otro mecanismo de control de la expresión de *isiA* e *isiB* es mediante el RNA no codificante IsiR. Este RNA, que se encuentra en el mismo operón *isiA-isiB*, se expresa cuando hay hierro en el medio y se une al RNA_m de los mismos provocando su degradación (Dühning et al., 2006).

Respecto a la fotosíntesis el déficit de hierro provoca la sustitución de la ferredoxina 1 (Fd1) por la flavodoxina, una flavoproteína (Ferreira y Straus, 1994). La estabilidad del RNA_m de la Fd1 ante estas circunstancias se altera mediante IsaR, mientras que *isiB*, regulada por FurA, se induce en déficit de hierro (Georg et al., 2017). El hecho de que se sustituya la Fd1 por la flavodoxina permite que en condiciones donde el hierro es limitante este paso del transporte electrónico fotosintético pueda realizarse. Los genes fotosintéticos regulados por hierro presentan una doble regulación. Así, FurA unido a hierro reprime la expresión del RNA no codificante IsaR que a su vez reprime a un gran número de genes de ambos fotosistemas, el citocromo b₆, Cit c₆, la síntesis de centros sulfoferricos y grupo hemo, ferredoxinas, y clorofila de forma que este represor actuará solamente cuando la concentración de hierro sea baja. Será en estas condiciones cuando la síntesis de estos compuestos que necesitan de hierro disminuya (Georg et al., 2017). En condiciones donde el hierro es bajo IsiA es la principal proteína de unión a clorofila que participa en la captación de energía en el tilacoide cuando el resto de pigmentos disminuyen (Burnap et al., 1993). Además, esta proteína está implicada en la disipación térmica de la energía absorbida y, por tanto, en la protección de los fotosistemas del exceso de energía en condiciones de deficiencia de hierro (Sandström et al., 2001). Como ya se ha comentado anteriormente la expresión de IsiA está regulada por FurA y por IsiR, sin embargo también parece estar regulado a nivel post-transcripcional por Fd2 (sll1382) (Leonhardt y Straus, 1994; Georg et al., 2017; Schorsch et al., 2018). De forma que esta ferredoxina parece estar implicada en la respuesta a hierro.

Otro regulador transcripcional que participa en esta homeostasis es PfsR, un regulador de la familia TetR cuyo transcrito se acumula en condiciones de limitación de hierro. El mutante carente de PfsR, presenta una mayor acumulación de clorofila a, carotenos, ficocianinas y proteínas de los fotosistemas en condiciones de limitación de hierro. Además de alterar la expresión de *furA*, *isiA* o *feoB* entre otros genes (Cheng y He, 2014). Por tanto, PfsR actuaría como un represor de dichos genes en condiciones de limitación de hierro.

8.2. Metabolismo y homeostasis del cobre.

El cobre, al igual que el hierro, es un metal esencial ya que actúa como cofactor de varias enzimas como las amino oxidasas, multicobre oxidasas, citocromo c

oxidasas, nitrito oxidasas, la plastocianina o superóxido dismutasas (Rademacher y Masepohl, 2012; Dennison et al., 2018; Kaur et al., 2019). La habilidad de pasar de Cu^+ a Cu^{2+} y viceversa, dependiendo de su estado de oxidación, es lo que favorece que este elemento actúe como un cofactor en procesos de transferencia electrónica. Sin embargo, como en el caso del hierro, también es lo que favorece que pueda participar en la generación de especies reactivas de oxígeno a través de la reacción de Fenton o Haber-Weiss, generando daño celular (Lloyd y Phillips, 1999; Kehrer, 2000). Además, un exceso de cobre puede hacer que este desplace a otros metales que actúan como cofactores dando por tanto lugar a enzimas con una actividad alterada (Waldron y Robinson, 2009). A pesar de esto las cianobacterias necesitan de la presencia de cobre en los tilacoides ya que ahí se encuentran la plastocianina y citocromo c oxidasas, dos cuproproteínas (Zhang et al., 1992; Lyons et al., 2012). De hecho, la presencia o ausencia de cobre produce cambios en los niveles de expresión de la plastocianina. Cuando el medio contiene cobre se produce la expresión y acumulación de esta proteína mientras que cuando la concentración de cobre en el medio es baja o nula los niveles de expresión del RNA_m que la codifica disminuyen y esto correlaciona con un aumento de la expresión del $\text{Cit } c_6$, el transportador electrónico alternativo a la plastocianina en cianobacterias (Zhang et al., 1992). Por tanto, en presencia de cobre se sintetiza como transportador electrónico una cuproproteína que sirve como reservorio del mismo mientras que en ausencia de cobre se sintetiza una proteína dependiente de hierro como transportador. Estos transportadores, a pesar de encontrarse en concentraciones milimolar en el lumen tilacoidal (Finazzi et al., 2005) son de gran importancia ya que mutantes carentes de Pc en medio con cobre y de $\text{Cit } c_6$ en medio sin cobre presentan un retraso en el crecimiento y en su capacidad fotosintética y de transporte electrónico al PSI (Durán et al., 2004; Durán, 2005). Por tanto, la eliminación de ambos transportadores en cianobacterias no es viable.

Anteriormente se creía que en cianobacterias la entrada de cobre al interior celular se realizaba mediante CtaA y al interior del tilacoide por PacS, con gasto de ATP en ambos casos. De forma que cuando el cobre entraba a la célula por CtaA este era transferido a Atx1 y este lo transfería a PacS, llegando finalmente al tilacoide (Badarau y Dennison, 2011; Badarau et al., 2013; Kay et al., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que ambos transportadores realmente están implicados en la exportación de cobre requiriendo ATP en lugar de en su importación (González-Guerrero et al., 2010; Andrei et al., 2020). Respectivo a esto, la ausencia de CtaA o PacS no afecta de forma significativa el transporte de cobre a la plastocianina, afectándose solo en el mutante CtaA (Totter et al., 2012). Igualmente, el transcrito de la plastocianina disminuye en los mutantes carentes de uno u otro transportador (más acusado en el de CtaA) pero no en el mutante de Atx1 (Waldron et al., 2010). Además, ambos transportadores son necesarios para la unión de cobre con CucA , una proteína periplásmica, por lo que de alguna forma estos transportadores afectan al metabolismo del cobre en el periplasma (Waldron et al., 2010). Por tanto, los mecanismos reales de entrada de cobre al interior celular, así como la interacción entre estos, son todavía desconocidos. Otra proteína implicada en el transporte de cobre en cianobacteria es la proteína periplásmica FutA2 , a pesar de que une hierro preferentemente. Se ha determinado que mutantes de esta proteína presentan una acumulación de $\text{Cit } c_6$ y una acumulación de cobre en el periplasma. Se cree que FutA2 actúa quelando el hierro periplásmico e impidiendo que este interfiera

negativamente con el transporte de cobre (Waldron et al., 2007). Todas las incógnitas generadas demuestran que el mecanismo de transporte de cobre al interior celular requiere ser abordado más detalladamente. En cuanto a la exportación de cobre en *Synechocystis* se ha encontrado una proteína homotrimérica de la membrana externa, TolC, que interacciona con varias proteínas de la membrana plasmática y genera un canal por el que se cree que podría salir cobre de la célula (Giner-Lamia et al., 2016a). Estas proteínas de membrana que participan en el transporte tanto de cobre como de hierro se cree que podrían generar un sistema de transporte interconectado. En *Anabaena* se ha demostrado una relación entre el transporte de hierro y de cobre a través del transportador TonB, cuya sobreexpresión genera estirpes sensibles a ambos metales (Stevanovic et al., 2013). Por último, un mecanismo de defensa para evitar la acumulación extrema de cobre es el formado por el operón *copMRS* y *copBAC*. Los genes de resistencia a cobre están regulados a nivel transcripcional por un sistema de dos componentes, el sistema CopRS. CopS es una histidín quinasa que se encuentra en la membrana tilacoidal y plasmática y es capaz de detectar el cobre, se cree que puede activar a CopR. Tras su activación este regulador se une, actuando como un activador, al promotor del operón *copBAC* (codifica para un sistema de resistencia que transporta el cobre al exterior celular) y al operón *copMRS* donde CopM es una proteína de unión a cobre que actúa a nivel periplásmico y extracelular favoreciendo la resistencia a cobre (Giner-Lamia et al., 2012, 2015)

Por tanto, la homeostasis del cobre es un proceso menos estudiado que la del hierro, aunque se cree que pueden tener puntos de interacción.

Materiales y Métodos

1. Organismos y condiciones de cultivo

1.1. Cianobacterias.

1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.

En el trabajo aquí presentado se han empleado estirpes mutantes de la cianobacteria *Synechocystis*, así como de la cianobacteria filamentosas fijadora de nitrógeno *Anabaena* sp. PCC 7120 (referida como *Anabaena*). Las estirpes utilizadas y sus características se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia	ORF Mutada	Organismo
Silvestre (WT)	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803			<i>Synechocystis</i>
PETJ	<i>petJ::C.C1</i>	Este trabajo	<i>sll1796</i>	<i>Synechocystis</i>
PETE	<i>petE::C.K1</i>	(Giner-Lamia et al., 2012)	<i>sll0199</i>	<i>Synechocystis</i>
PETEJ	<i>petE::C.K1</i> <i>petJ::Cm^R</i>	Este trabajo	<i>sll0199</i> <i>sll1796</i>	<i>Synechocystis</i>
PETP	<i>petP::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0241</i>	<i>Synechocystis</i>
PETR	<i>petR::Sp/St^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i>	<i>Synechocystis</i>
PETR2	<i>petR::Sp/St^R</i> <i>glnN::P_{petR}::PetR::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
PETR3	<i>petR::Sp/St^R</i> <i>glnN::P_{cpbB}::PetR::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
SLR0601	<i>slr0601::nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0601</i>	<i>Synechocystis</i>
PETJP	<i>petP::Ery^R</i> <i>petJ::Cm^R</i>	Este trabajo	<i>slr0241</i> <i>sll1796</i>	<i>Synechocystis</i>
PETJR	<i>petR::Sp/St^R</i> <i>petJ::Cm^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>sll1796</i>	<i>Synechocystis</i>
PETEP	<i>petP::Ery^R</i> <i>petE::C.K1</i>	Este trabajo	<i>slr0241</i> <i>sll0199</i>	<i>Synechocystis</i>
PETER	<i>petR::Sp/St^R</i> <i>petE::C.K1</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>sll0199</i>	<i>Synechocystis</i>
PETRP	Δ <i>petRP::Sp/St^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i>	<i>Synechocystis</i>
PETRP+ RP	Δ <i>petRP::Sp/St^R phaAB::petRP::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i> <i>slr1993</i> <i>slr1994</i>	<i>Synechocystis</i>
PETRP+ HAHA	Δ <i>petRP::Sp/St^R phaAB::petRP_HAHA::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i> <i>slr1993</i> <i>slr1994</i>	<i>Synechocystis</i>
PETRP+ M53A	Δ <i>petRP::Sp/St^R phaAB::petRP_M53A::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i> <i>slr1993</i> <i>slr1994</i>	<i>Synechocystis</i>
PETRP+ M58A	Δ <i>petRP::Sp/St^R phaAB::petRP_M58A::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i> <i>slr1993</i> <i>slr1994</i>	<i>Synechocystis</i>

Estirpe	Genotipo	Referencia	ORF Mutada	Organismo
PETRP+ M53AM58 A	<i>ΔpetRP::Sp/St^R</i> <i>phaAB::petRP_M53AM58A::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0240</i> <i>slr0241</i> <i>slr1993</i> <i>slr1994</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF	<i>slr0952::Sp/St^R</i>	Huertas Romera, María José	<i>slr0952</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/S	<i>slr2094::Ery^R</i>	(García- Cañas, 2015)	<i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
C75SC84 S	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_slr2094_C75S/C84S:N</i> <i>at^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i>	<i>Synechocystis</i>
C99S	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_slr2094_C99S:Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i>	<i>Synechocystis</i>
SBPasa	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i>	<i>Synechocystis</i>
FBPasa	<i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/S+S	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/S+F	<i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0288</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
S+F	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF+S	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr0952</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF+F	<i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i>	Este trabajo	<i>slr0288</i> <i>slr0952</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/S+S+ F	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr2094</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF+S+F	<i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr0952</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/ΔF+ S	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0796</i> <i>slr0952</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/ΔF+ F	<i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0288</i> <i>slr0952</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/ΔF+ S+F	<i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr0952::Sp/St^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0288</i> <i>slr0796</i> <i>slr0952</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>
TrxF	<i>arsBHC::P_{cpcB}:trxF1:Sp/St^R</i>	(Tejada Gómez, 2018)	<i>slr0944</i> , <i>slr0945</i> <i>slr0946</i>	<i>Synechocystis</i>
S+F+ TrxF	<i>arsBHC::P_{cpcB}:trxF1:Sp/St^R</i> <i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i>	Este trabajo	<i>slr0944</i> , <i>slr0945</i> <i>slr0946</i> <i>slr0796</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/S+S+ F+TrxF	<i>arsBHC::P_{cpcB}:trxF1:Sp/St^R</i> <i>nrsD::P_{cpcB}:6His_AtSBPasa:C.K1</i> <i>glnN::P_{cpcB}:6His_PsFBPasa:Nat^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0944</i> , <i>slr0945</i> <i>slr0946</i> <i>slr0796</i> <i>slr2094</i> <i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
ΔF/ΔF	<i>slr0952::Sp/St^R</i> <i>slr2094::Ery^R</i>	Este trabajo	<i>slr0952</i> <i>slr2094</i>	<i>Synechocystis</i>

Estirpe	Genotipo	Referencia	ORF Mutada	Organismo
S/F	<i>glnN::P_{cpcB}:FBP/SBPasa_{6His}:Nat^R</i>	(García-Cañas, 2016)	<i>slr0288</i>	<i>Synechocystis</i>
Silvestre (WT_An)	<i>Anabaena sp. PCC 7120</i>			<i>Anabaena</i>
PETR_An	<i>ΔpetR</i>	Este trabajo	<i>arl2569</i>	<i>Anabaena</i>
PETP_An	<i>petP::Nat^R</i>	Este trabajo	<i>arl2570</i>	<i>Anabaena</i>

1.1.2. Medios y condiciones de cultivo.

Las distintas estirpes de *Synechocystis* se cultivaron fotoautotróficamente, mixotróficamente, o heterotróficamente en medio BG11 (Rippka et al., 1979). Este mismo medio suplementado con 12 mM de NaHCO₃ se denomina BG11c y para generar las condiciones de mixotrofia y fotoheterotrofia al medio BG11c se añadió glucosa 10 mM (+G) o glucosa 10 mM y DCMU (3-(3,4-dichlorofenil)-1,1-dimetilurea) 50 μM respectivamente; la glucosa fue esterilizada mediante filtración. La composición detallada del medio se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio BG11

NaNO ₃	17,8 mM	Citrato férrico amónico (17% Fe)	6mg/L
MgSO ₄	0,30 mM	MnCl ₂	9,1 μM
CaCl ₂	0,24 mM	Na ₂ -EDTA	2,4 μM
Na ₂ CO ₃	0,20 mM	Na ₂ MoO ₄	1,6 μM
K ₂ HPO ₄	0,20 mM	ZnSO ₄	0,8 μM
H ₃ BO ₃	46 μM	CuSO ₄	0,3 μM
Ácido cítrico	28,5 μM	CoCl ₂	0,2 μM

En caso de tratarse de cultivos realizados en ausencia de cobre el medio se realizó con agua miliQ, sin la adición de CuSO₄ y empleando sales de alto grado de pureza (BG11c-Cu o BG11-Cu).

Para el crecimiento de las estirpes generadas resistentes a antibióticos el medio se suplementó con el antibiótico requerido, siendo estos previamente esterilizados por filtración, y se añadieron al medio tras su autoclavado. La concentración de estos se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de antibióticos empleadas en las estirpes de cianobacterias.

Antibiótico	Concentración
Kanamicina (km)	50 μg/ml
Espectinomicina (Sp)	5 μg/ml
Estreptomina (St)	5 μg/ml
Erytromicina (Ery)	5 μg/ml
Nourseotricina (Nat)	50 μg/ml
Cloranfenicol (Cm)	20 μg/ml

Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 y 250 ml con una quinta parte del volumen del cultivo en agitación de 100 rpm en incubadores orbitales IKA Laborthechnik KS501 en cámaras de cultivo termostatizadas a 30 °C,

con una iluminación continua ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o $10 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para los realizados en +G o +G+DCMU) suministrada por paneles de tubos LED. También se realizaron experimentos con cultivos en medio líquido con de burbujeo en aire suplementado con 1% CO_2 (v/v), 3% CO_2 (v/v) o solo en aire, en frascos de Roux de 750 ml o tubos cilíndricos de 40 a 180 ml en las mismas condiciones de temperatura e iluminación. En los experimentos donde se estudió la respuesta a estrés lumínico se emplearon distintas intensidades: 200 o $550 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Para el crecimiento de cultivos en medio sólido se empleó medio BG11, BG11-Cu, BG11c o BG11c-Cu estéril suplementado con agar (Bacto-Agar, Difco) al 1% (p/v). La esterilización de los medios y el agar se realizó de forma independiente en autoclave a 120°C y más de 1 atmósfera de presión durante 20 minutos, mezclándose posteriormente. En el caso de los cultivos en mixotrofia o fotoheterotrofia se añadió la glucosa y la glucosa junto al DCMU al medio tras esterilizarlo. La mezcla de ambos se vertió en placas de Petri de 50 o 100 ml; los organismos crecieron en las mismas condiciones de iluminación y temperatura que los realizados en medio líquido.

Las estirpes usadas para estudiar el intercambio *petJ/petE* fueron cultivadas en BG11c-Cu con condiciones de burbujeo en aire suplementado con 1% CO_2 (v/v) hasta la fase exponencial, añadiéndose posteriormente la cantidad indicada de Cu^{2+} o de ácido batocuproinedisulfónico (BCSA) $300 \mu\text{M}$.

Para el estudio comparativo del crecimiento de distintas estirpes en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia las estirpes se cultivaron en placas con medio sólido suplementado con glucosa 10 mM y posteriormente en medio líquido con glucosa hasta alcanzar la fase exponencial. Tras alcanzar dicha fase los cultivos se lavaron dos veces con medio BG11c para eliminar la glucosa del medio y se resuspendieron de nuevo en medio BG11c. Estos cultivos posteriormente se dividieron en el número de cultivos requeridos para cada experimento y se añadió glucosa 10 mM y DCMU $50 \mu\text{M}$ cuando fuese necesario.

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

1.2.1 Estirpes de *E. coli* utilizadas.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y sus genotipos correspondientes se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	<i>F-</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>mK+</i> , <i>rK-</i>) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80- <i>lacZ</i> Δ M15)	(Hanahan, 1983)
BL21	<i>hsdS</i> <i>gal</i> (λ clts857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lac</i> UV5-T7 <i>gene1</i>)	(Studier y Moffatt, 1986)
HB101	<i>F-</i> <i>hsdS20</i> (<i>rB-mB-</i>) <i>leu</i> <i>supE44</i> <i>ara14</i> <i>galk2</i> <i>lacY1</i> <i>proA2</i> <i>rpsL20</i> <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i> <i>recA13</i> <i>mcrB</i> . pRL623	(Elhai y Wolk, 1988)
ED8654	<i>lac-3</i> o <i>lacY1</i> <i>supE44</i> <i>supF58</i> <i>hsdR514</i> (<i>rk - mk -</i>) <i>recA56</i> <i>mcrA1</i> <i>metB1</i> <i>lacY</i> <i>galk2</i> <i>galT22</i> <i>trpR55</i> pRL623	(Elhai y Wolk, 1988)

1.2.2. Medios y condiciones de cultivo.

Para los cultivos de *E. coli* se empleó el medio de cultivo de Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) cuya composición está detallada en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio LB.

NaCl	10 g/L
Bactotripton	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L

Para preparar el medio sólido se añadió agar a una concentración final de 1,5% (p/v). Los medios se autoclavaron como se indica en el apartado 1.1.2. Cuando fue necesario tanto el medio sólido como el medio líquido fueron suplementados con algunos de los compuestos estériles descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Compuestos empleados en las estirpes de *E. coli*.

Compuesto	Concentración
Ampicilina	100 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
Estreptomina	100 µg/ml
Espectinomicina	100 µg/ml
Nourseotricina	50 µg/ml
Cloranfenicol	40 µg/ml
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)	0,2 µM
IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)	0,5 µM

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos o matraces Erlenmeyer con 1/5 del volumen ocupado por el medio empleado y con agitación orbital continua de 200 rpm en equipos Innova@43 (New Brunswick Scientific). Para algunos de estos cultivos se empleó medio LB y para otros medio mínimo M9 (Neidhardt et al., 1974) suplementado con LB 0,1%. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas de Petri estériles; en ambos casos se incubaron a 37 °C.

1.3. Métodos de recogida de células.

Las células de las distintas estirpes de *Anabaena* se recogieron mediante filtración por vacío empleando filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore HA). En el caso de las células de *E. coli* y *Synechocystis* se recogieron por centrifugación empleando una microcentrífuga Eppendorf 5415R a temperatura ambiente o centrifuga refrigerada (tubos de 1,5 o 2 ml), centrifuga Eppendorf 5804R (tubos de 15 o 50 ml) y centrifuga Beckman Avanti J-25 (tubos GSA o SS34). Los lavados para eliminar la glucosa del medio se realizaron a temperatura ambiente.

2. Métodos de biología molecular

2.1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

2.1.1. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos sintéticos (StabVida) empleados en esta tesis, así como el proceso en que se emplearon se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido (número)	Secuencia 5'→3'	Uso
copY_KO_F (223) copY_KO_R (224)	CCAAGGCAAGATTGTGGTGC CCTGTTCCGGAGACAGCAAT	Generación de PETR
slr0241_check_F (248) slr0241_check_R (249)	CAACAGCGACAGGAGGAGAA AAAGCTCCGGTTGAGAAGGG	Generación de PETP
copY_KO_F (223) slr0241_check_R (249)	CCAAGGCAAGATTGTGGTGC AAAGCTCCGGTTGAGAAGGG	Comprobación de la segregación <i>petR</i> , <i>petP</i> y <i>petRP</i>
copY_complementation _Fw (256) copY R NotI (234)	GACTGAATTCCCCGGCGATCGCG CCTTTATC ATGCGGCCGAAATACTGTGCATTAT TTCTCC	Generación de PETER2
copY_OE_Fw_Sall (258) copY R NotI (234)	GTCGACGGAGGTTATCATTATGAG CTGGATTCCCCC ATGCGGCCGAAATACTGTGCATTAT TTCTCC	Generación de PETER3
petEF (172) petER (173)	ACAATCCTCGCTGGCCTTCT CGACAACTTTGCTACCATG	Generación de la sonda de <i>petE</i>
PETEMF (277) PETEMR (278)	TAAGTTAGGGAGATTGTGCCAG TCCAAATTTCTTGGCTCTGTC	Comprobación de la segregación <i>petE</i>
Prom_petE_NotI (53) petE_ATG_Sal (92)	CGGCGGCCGCTGAGGCTGTATAAT CTACG CAGTCGACTTGGCGATTGTATCTAT AGGG	Generación de la sonda del promotor <i>petE</i> de los retados
oligo F1_new_petJSall (299) oligo R3 (262)	GATCGTCGACCCACTTCACAAACCT AGCCAAT CGCGAAGGTATTATGGGAGGCGGT CCAGGCAAA	Generación de la sonda del promotor de <i>petJ</i> de los retados
petJF (174) petJR (175)	ATTCAACCAAGCTAGCCGAA TCCGCTTGATCAAGCACGTA	Generación de la sonda de <i>petJ</i>
petJ KO F (235) petJ KO R (236)	CGAGACGGCACTGAGGATTT AGTTGGGCTTTACGGGCTAC	Comprobación de la segregación de <i>petJ</i> y creación del mutante PETJ
slr0601_KO_5F (287) slr0601_KO_5R_HindIII (288)	TAGATGGCACTGTGGTGGAA ATCGAAGCTTTTTTCCGGTGACTTG GTTTC	Generación del fragmento 5' de SLR0601
slr0601_KO_3F_HindIII (289) slr0601_KO_3R (290)	GGAAAAAAGCTTCGATTCCGTTGG CATGGTAGGTAT CAGGTCAGGATTTTCCCTCA	Generación del fragmento 3' de SLR0601
slr0601_KO_5F (287) slr0601_KO_3R (290)	TAGATGGCACTGTGGTGGAA CAGGTCAGGATTTTCCCTCA	Comprobación de la segregación de SLR0601

Oligonucleótido (número)	Secuencia 5'→3'	Uso
slr0601F (275) slr0601R (276)	GTCTTTAGACTGCAGCAGCC TGATTGCTGTGCTCCATGGG	Generación de la sonda de <i>slr0601</i>
slr0601_retardo_F_Sall (295) slr0601_retardo_R_NotI (296)	GCCAGTCGACCCCGCAAATGGATT CATTAG ACATGCGGCCGCTTAGTAAATTTCT GCTAAAAG	Generación de la sonda del promotor <i>slr0601</i> de los retardos
slr0602F (273) slr0602R (274)	GGTGGTTTAACCCTCACTCTA GACGGGCCATCTCATTCACTA	Generación de la sonda de <i>slr0602</i>
COPM1F (389) COPM1R (390)	AGCATTCCCATGGGTAATCAATTCT GGATAT CATCTCGAGTCACTGACCATAACCAG TTTTATA	Generación de la sonda de <i>copM</i>
copY_complementation_Fw (256) slr0241_R_XhoI (257)	GACTGAATTCCTCCCGGCGATCGCG CCTTTATC ATGCGCTCGAGTCACTGAATAGC TTGAAC	Generación del mutante PETRP y del mutante PETRP+RP
petP_HXA_HXA_F (283) slr0241_R_XhoI (257)	TTAGCTGCTGAAAATGCCGCTCGTT TTTACCGGGAT ATCGCTCGAGTCACTGAATAGCTT GAAC	Generación del fragmento 5' de PETRP+HAHA
petP_HXA_HXA_R (284) copY_complementation_Fw (256)	AAAACGAGCGGCATTTTCAGCGGC TAAGACCGCATT GACTGAATTCCTCCCGGCGATCGCG CCTTTATC	Generación del fragmento 3' de PETRP+HAHA
petP M53A_F (279) slr0241_R_XhoI (257)	GCCTGGAAGGGCTGTGGTTGG ATCGCTCGAGTCACTGAATAGCTT GAAC	Generación del fragmento 5' de PETRP+M53A
petP M53A_R (280) copY_complementation_Fw (256)	ACAGCCCTTCCAGGCGATCGC GACTGAATTCCTCCCGGCGATCGCG CCTTTATC	Generación del fragmento 3' de PETRP+M53A
petP M58A_F (281) slr0241_R_XhoI (257)	GGTTGGAAGTTTGGCTTCCCC ATCGCTCGAGTCACTGAATAGCTT GAAC	Generación del fragmento 5' de PETRP+M58A y de PETRP+M53A58A
petP M58A_R (282) copY_complementation_Fw (256)	GCCAACTTCCAACCACAGCC GACTGAATTCCTCCCGGCGATCGCG CCTTTATC	Generación del fragmento 3' de PETRP+M58A y de PETRP+M53AM58A
phaA_checkF (217) phaB_checkR (218)	CATCCCAACCCATGGCATTGG TAATACTTCGCCGGTGACATAG	Comprobación de la segregación de PETRP+RP, PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A.
An_petRKO_5_F_SacI_BHI (292) An_petRKO_5_R_HindIII (293)	AGGAGCTCGGATCCAGTACTTTC CCACCACCACGC CTGGCAAGCTTACATTTGTTTAGGA CGATAGTCGGG	Generación del fragmento 5' de PETR_An
An_petRKO_3_F_HindIII (294) An_petRKO_3_R_NcoI_XhoI (295)	AAACAAATAAGCTTGCCAGGGAGG AACAATGATGC CTCTCGAGCCATGGGTAGAAAATC AACAAGGTGAAAT	Generación del fragmento 3' de PETR_An
An_petRKO_3_R_NcoI_BHI (370) AnPetR_check_5 (371) AnPetP_5_HIII_F (373)	CTGGATCCCCATGGGTAGAAAATC AACAAGGTGAAAT CCAGTTCTGGTGTGCAGTCAAGG AGCAAGCTTCGCATCCCAAGTTGAT CC	Comprobación de la segregación de PETR_An y de PETP_An
		Generación del fragmento 5' de PETP_An

Oligonucleótido (número)	Secuencia 5'→3'	Uso
An_petRKO_5_R_SacI_BHI (292)	GGAGCTCGGATCCAGTGACTTTCC CACCACCACGC	
AnPetP_3_HIII_F (372) An_petRKO_3_R_NcoI_XhoI (295)	GCGAAGCTTGCTGTCAAAATCATCA GCG CTCTCGAGCCATGGGTAGAAAATC ACAAGGTGAAAT	Generación del fragmento 3' de PETP_An
slr2094_F_NdeI (142) slr2094_R_NotI (143)	TTCAAGCTAGCGACAGCACCTCG G ATAGCGGCCGCGAGGGAAATTAAT G	Generación de los mutantes puntuales de las cisteínas de la FBP/SBPasa
SBPasa_C75S_Fw (250) slr2094_R_NotI (143)	GAAGTAGGCATTTCGCACCAGAGAA ATAGCGGCCGCGAGGGAAATTAAT G	Generación del fragmento 5' de la secuencia C75S/C84S y C99S/C75S
SBPasa_C75S_Rv (251) slr2094_OE_Sall (164)	TTCTCTGGTGCTAATGCCTACTTC CCCTCTGGTTCGACTTTTGACTATT	Generación del fragmento 3' de la secuencia C75S/C84S y C99S/C75S
SBPasa_C99S_Fw (254) slr2094_R_NotI (143)	GCTGTTGACCCAGCGAAGGTACCA AC ATAGCGGCCGCGAGGGAAATTAAT G	Generación del fragmento 5' de la secuencia C99S y C99S/C84S
SBPasa_C99S_Rv (255) slr2094_OE_Sall (164)	GTTGGTACCTTCGCTGGGGTCAAC AGC CCCTCTGGTTCGACTTTTGACTATT	Generación del fragmento 3' de la secuencia C99S y C99S/C84S
AtSBPasa_R_XhoI (264) AtSBPasa_madura_F_NdeI (265)	AGTCCTCGAGCTAAGCGGTAAGTTC CAATGG AGTCCATATGACAAAAGCTAAGAGC AATGG	Generación del mutante S.
arsB_ORF_rev_XhoI_HII (346) 5_arsB_BssHI (347) Sp_R_HindIII (214)	AACTCGAGAAGCTTGCTGGCAATTA GGCAAAGTT AAGCGCGCCGCCCATCTTTAACA CTTG AAAGCTTAAGGCCATCCGTCAGGA TGGCCTTCTTGCGGATGTTGCGATT ACTTC	Comprobación de los mutantes que expresan TrxF1
slr2094_R_NotI (143) slr2094_OE_Sall (164)	ATAGCGGCCGCGAGGGAAATTAAT G CCCTCTGGTTCGACTTTTGACTATT	Comprobación de la segregación de ΔF/S
slr0952_F_NdeI (144) slr0952_R_NotI (145)	TTTTACATATGACCGTTAGTGAGAT TC TTTGCGGCCGCTAAGTAACTAATT ACCC	Comprobación de la segregación de ΔF
glnN_check_F (50) glnN_check_R (51) Prom_CK1_R (41)	ATGCAGGCCAGTCTTCCTAA AAATGGCAGTGTCCAAGTCC AAGAGTGGTACCCATGGTAAACGA TCCTCATCCTGTCTC	Comprobación de la segregación de FBPasa, de C75S/C84S y de C99S

Oligonucleótido (número)	Secuencia 5'→3'	Uso
5_nrsD_BssHII_F (204) 3_nrsD_BssHII_R (207)	AAGCGCGCCTTTCACTGCTTGCGG AACC CAAGCGCGCCTCGGAGTCATGGTG ATGGG	Comprobación de la segregación de las estirpes que presentan la SBPasa de <i>A. thaliana</i>
glnN_check_F (50) glnN_check_R (51)	ATGCAGGCCAGTCTTCCTAA AAATGGCAGTGTCCAAGTCC	Comprobación de la segregación de las estirpes que presentan la SBPasa de <i>P. sativum</i>
rnpB_LEFT (178) rnpB_RIGHT (179)	GAGTTGCGGATTCCTGTCAC AATTCCTCAAGCGGTTCCAC	Generación de la sonda de <i>rnpB</i>
slr0601_retardo_F_Sall (295) slr0601_retardo_R_NotI (296)	GCCAGTCGACCCCGCAAATGGATT CATTAG ACATGCGGCCGCTTAGTAAATTTCT GCTAAAAG	Generación de la sonda de <i>slr0601</i>

2.1.2. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo, pero no construidos en el mismo, así como los utilizados y construidos se especifican, junto con sus principales características, en la Tabla 8 y Tabla 9 respectivamente.

Tabla 8. Plásmidos no construidos en este trabajo y su descripción.

Plásmido	Resistencia	Referencia	Descripción
pET28	Km	Novagen	Plásmido donde la expresión está controlada bajo el promotor del fago T7. Contiene dianas para añadir una cola de histidinas en ambos extremos de la proteína.
pSpark® II	Ap	Canvax Biotech	Plásmido usado para clonar fragmentos de PCR. Contiene el fragmento α de la β -galactosidasa para seleccionar a los clones con inserto.
pCSRO	Sp/St	(Merino-Puerto et al., 2010)	Vector movilizable derivado de pCSV3 conteniendo el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .
pslr2094_Ery	Ery	(García-Cañas, 2015)	Plásmido para generar el mutante Δ FBP/SBPasa de <i>Synechocystis</i> .
plat_nrsD_PcpcB_Kmv3R	Ap Km	Colección del laboratorio	Derivado del plásmido pBSII-KS(+) que contiene regiones de <i>nrsD</i> interrumpido por el promotor de <i>cpcB</i> , y un gen de resistencia a Km. Incluye un sitio de clonaje múltiple para expresar genes bajo el P_{cpcB} .
pglnN_PcpcB_natR	Ap Nat	Colección del laboratorio	Derivado del plásmido pBSII-KS(+) que contiene regiones de <i>glnN</i> interrumpido por el

Plásmido	Resistencia	Referencia	Descripción
			promotor de <i>cpcB</i> , y un gen de resistencia a Nat. Incluye un sitio de clonaje múltiple para expresar genes bajo el P _{cpcB} .
pGLNN::natT	Ap Nat	Colección del laboratorio	Derivado del plásmido pBSII-KS(+) que contiene regiones de <i>glnN</i> interrumpido por el gen de resistencia a Nat. Incluye un sitio de clonaje múltiple.
plat phaAB_PcpcB_NatR	Ap Nat	Colección del laboratorio	Derivado del plásmido pBSII-KS(+) que contiene regiones de <i>phaAB</i> interrumpido por el promotor de <i>cpcB</i> , y un gen de resistencia a Nat. Incluye un sitio de clonaje múltiple para expresar genes bajo el P _{cpcB} .
plat_arsB_PcpcB_Sp	Sp/St	(Tejada Gómez, 2018)	Derivado del plásmido pBSII-KS(+) que contiene regiones de <i>arsBHC</i> interrumpido por el promotor de <i>cpcB</i> , y un gen de resistencia a Sp/St. Incluye un sitio de clonaje múltiple para expresar genes bajo el P _{cpcB} .
pET28-trxf1	Km	Laboratorio de FJ Cejudo	Derivado del plásmido pET28 empleado para generar el plásmido plat_arsB_PcpcB_trxF1_Sp.
plat_arsB_PcpcB_trxF1_Sp	Ap Sp/St	Colección del laboratorio	Plásmido donde TrxF1 se expresa bajo el P _{cpcB} . Para esto el plásmido pET28-trxf1 y plat_arsB_PcpcB_Sp se cortaron con <i>XbaI</i> y <i>XhoI</i> , ligándose el plásmido plat_arsB_PcpcB_Sp linealizado y el inserto de 900 pb derivado del plásmido pET28-trxf1 se ligaron.
pET28_slr2094	Km	Colección del laboratorio	Plásmido empleado para expresar la proteína FBP/SBPasa.
pET28_slr0952	Km	Colección del laboratorio	Plásmido empleado para expresar la proteína FBPasa.
pET28_slr2094_C75S	Km	(García-Cañas, 2016)	Plásmido empleado para expresar la proteína FBP/SBPasa C75S.
pET28_slr2094_C84S	Km	(García-Cañas, 2016)	Plásmido empleado para expresar la proteína FBP/SBPasa C84S.
pAMC100	Km	(Carrasco et al., 1994)	Plásmido empleado para expresar la proteína FBPasa cloroplastídica de guisante

Tabla 9. Plásmidos contruidos en este trabajo y su descripción.

Plásmidos	Resistencia	Características
pPETR	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 1524 pb amplificada por los oligos 223-224. Es decir, <i>petRP</i> .
pPETR_Sp	Ap Sp/St	Plásmido derivado de pPETR en el que se ha insertado en sentido positivo el cassette de resistencia Sp/St. Para esto el plásmido pPETR se cortó con <i>EcoRV</i> aprovechando que la ORF <i>slr2040</i> tras 31 aminoácidos presenta el sitio de corte de la enzima.
pSPARK_petR_com		Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 629 pb amplificada por los oligos 256-234. Incluye el gen <i>petR</i> y su promotor.
pglN::PpetR_petR	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_petR_com donde este y el plásmido pGLNN::natT fueron digeridos con <i>EcoRI</i> y <i>NotI</i> .
pSPARK_petR_com3		Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 482 pb amplificada por los oligos 258-234. Incluye el gen <i>petR</i> y su promotor
pglN::PcpcB_rbs_copY	Ap NAT	Plásmido derivado de pSPARK_petR_com donde este y el plásmido pglN_PcpcB_natR fueron digeridos con <i>SalI</i> y <i>NotI</i> .
pPETP	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 970 pb amplificada por los oligos 248-249. Es decir, <i>petRP</i> .
pPETP_Ery	Ap Ery	Plásmido derivado de pPETR en el que se ha insertado en sentido positivo el cassette de resistencia Ery. Para esto el cassette fue cortado con <i>XbaI</i> y el plásmido pPETP con <i>NheI</i> , aprovechando el corte de esta enzima en la ORF <i>slr0241</i> en las bases número 210 y 792. Al ser ambos cortes compatibles tanto el plásmido linealizado como el cassette se ligaron.
pPETJ	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 1023 pb amplificada por los oligos 235-236. Es decir, <i>petJ</i> .
pPETJ_Cm	Ap Cm	Plásmido derivado de pPETJ en el que se ha insertado en sentido positivo el cassette de resistencia Cm. El cassette fue cortado con <i>XbaI</i> y el plásmido pPETJ con <i>NheI</i> , aprovechando el corte natural de esta enzima en el gen que <i>petJ</i> . Al ser ambos cortes compatibles se ligó el plásmido linealizado con el cassette.
pPETRP	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 1492 pb amplificada por los oligos 256-257. Es decir, <i>petRP</i> .

Plásmidos	Resistencia	Características
pPETRP_Sp.	Ap Sp/St	Plásmido derivado de pPETRP en el que se ha insertado en sentido positivo el cassette de resistencia Ery. Para esto el plásmido se digirió con <i>BstEII</i> , aprovechando que el operón <i>slr0240-41</i> tenía un sitio de corte natural de esta enzima entre las bases 351 y 1205. El cassette de resistencia fue digerido por <i>HincII</i> . Aprovechando que el corte de ambas enzimas es compatible el plásmido linealizado y la resistencia se ligaron.
pSpark_slr0601	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 287-290 de los fragmentos amplificados por los oligos 287-288 y 289-290, el fragmento final cuenta con una diana <i>HindIII</i> en el interior. El fragmento generado por la amplificación con 287-288 fue de 427 pb y el generado por los oligos 289-290 de 466 pb. El fragmento final con los oligos 287-290 fue de 893 pb, 173 pb menos que el gen <i>slr0601</i> .
slr0601::nat	Ap Nat	Plásmido derivado de pSpark slr0601 en el que se ha insertado en sentido positivo el cassette de resistencia Nat por el corte con <i>HindIII</i> . A cada lado del inserto quedan 427 pb y 466 pb respectivamente.
pPHAB_Nat_petRP_WT	Ap Nat	Plásmido derivado de pPETRP donde este y pPlat_phaAB_PcpcB_NatR se cortaron con <i>EcoRI-XhoI</i> . Del primer plásmido se obtuvieron los genes <i>petRP</i> que se introdujeron en el plásmido pPlat_phaAB_PcpcB_NatR linealizado por el corte donde se había, por tanto, eliminado el promotor de <i>cpcB</i> .
pSPARK_petRP_HAHA	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 256-257 de los fragmentos de 1073 pb y 431 pb amplificados por 284-256 y 283-257 respectivamente. Esta PCR solapante generó un fragmento de 1492 pb que se introdujo en pSparkII.
pPHAB_Nat_petRP_HAHA	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_petRP_HAHA y pPlat_phaAB_PcpcB_NatR que fueron procesados como en el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT.
pSPARK_petRP_M53A	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 256-257 de los fragmentos de 770 pb y 725 pb amplificados por 280-256 y 279-257 respectivamente. La PCR solapante generó un fragmento de 1492 pb que se clonó en pSparkII.

Plásmidos	Resistencia	Características
pPHAB_Nat_petRP_M53A	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_petRP_M53A y pPlat_phaAB_PcpcB_NatR que fueron procesados como en el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT.
pSPARK_petRP_M58A	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 256-257 de los fragmentos de 710 pb y 785 pb amplificados por 282-256 y 281-257 respectivamente. La PCR solapante generó un fragmento de 1492 pb que se clonó en pSparkII
pPHAB_Nat_petRP_M58A	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_petRP_M61A y pPlat_phaAB_PcpcB_NatR que fueron procesados como en el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT.
pSPARK_petRP_M53A_M58A	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 256-257 de los fragmentos de 710 pb y 785 pb amplificados por 282-256 y 281-257 respectivamente sobre pPHAB_Nat_petRP_M53A. La PCR solapante generó un fragmento de 1492 pb que se clonó en pSparkII
pPHAB_Nat_petRP_M53A_M58A	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_petRP_M53A_M58A y pPlat_phaAB_PcpcB_NatR que fueron procesados como en el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT.
pSpark_AnpetR	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada de 1978 pb mediante PCR solapante con los oligos 292-295 de los fragmentos de 757 pb y 1223 pb amplificados por 292-293 y 294-295 respectivamente. Esta amplificación corresponde a la región de petRP; delecionando 340 pb del gen <i>petR</i> .
pCSRO_An_petR	Sp/St	Plásmido derivado de pSpark_AnpetR y pCSRO. Ambos plásmidos se cortaron con <i>XhoI-BamHI</i> , obteniéndose del primer plásmido la región insertada que correspondía petR y ligándose esta con el plásmido pCSRO linealizado.
pSPARK_An_petP	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región de 2319 pb amplificada mediante PCR solapante con los oligos 292-295 de los fragmentos de 1720 pb y 599 pb amplificados por 292-373 y 372-295 respectivamente. Se deleccionaron 590 pb del gen <i>petP</i> .
pSPARK_AnP::nat	Ap Nat	Plásmido derivado de pSPARK_An_petP que fue cortado con <i>HindIII</i> para introducir un cassette de resistencia a nourseotricina, este

Plásmidos	Resistencia	Características
		cassette también fue digerido con la misma enzima para poder ligar ambos.
pCSRO_AnpetP_Nat_5	Sp/St Nat	Plásmido derivado de pSPARK_AnP::nat y pCSRO donde ambos fueron cortados con <i>XhoI-BamHI</i> . De forma que del primer plásmido se obtuvo el inserto que contenía la región amplificada por los oligos 292-295 más la resistencia y esto se ligó con el plásmido pCSRO linealizado.
pSPARK_SBPasa_C84S_C75S	Ap	Plásmido derivado de pSparkII que contiene la región amplificada mediante PCR solapante con los oligos 142-143 (1134 pb). La PCR solapante se realizó usando como base los fragmentos amplificados por PCR sobre pET28_slr2094_C84S usando los pares de oligos 250-143 (847 pb) y 251-142 (316 pb).
pET28_SBPasa_C84S_C75S	Km	Plásmido derivado de pET28 que contiene el resultado de ligar pSPARK_SBPasa_C84S_C75S y pET28 que han sido cortados con <i>NotI-NheI</i> y posteriormente ligados.
pSPARK_SBPasa_C99S	Ap	Plásmido generado mediante PCR solapante de igual forma a pSPARK_SBPasa_C84S_C75S. La PCR solapante se realizó usando como base los fragmentos amplificados por PCR de pET28_slr2094 usando los pares de oligos 254-143 (774 pb) y 255-142 (387 pb).
pET28_SBPasa_C99S	Km	Plásmido derivado de pET28 que contiene el resultado de ligar pSPARK_SBPasa_C99S y pET28 que han sido cortados con <i>NotI-NheI</i> y posteriormente ligados.
pSPARK_SBPasa_C99S_C75S	Ap	Plásmido generado mediante PCR solapante de igual forma a pSPARK_SBPasa_C99S. La PCR solapante se realizó usando como base los fragmentos amplificados por PCR sobre pET28_slr2094_C99S usando los pares de oligos 250-143 (847 pb) y 251-142 (316 pb).
pET28_SBPasa_C99S_C75S	Km	Plásmido derivado de pET28 que contiene el resultado de ligar pSPARK_SBPasa_C99S_C75S y pET28 que han sido cortados con <i>NotI-NheI</i> y posteriormente ligados.
pSPARK_SBPasa_C84S_C99S	Ap	Plásmido generado mediante PCR solapante de igual forma a pSPARK_SBPasa_C99S. La PCR solapante se realizó usando como base los fragmentos amplificados por PCR sobre pET28_slr2094_C84S usando los pares de oligos 254-143 (774 pb) y 255-142 (387 pb).

Plásmidos	Resistencia	Características
pET28_SBPasa_C84S_C99S	Km	Plásmido derivado de pET28 que contiene el resultado de ligar pSPARK_SBPasa_C84S_C99S y pET28 que han sido cortados con <i>NotI-NheI</i> . y posteriormente ligados
glnN_PcpcB+His_slr2094_C99S	Ap Nat	Plásmido derivado de pET28_SBPasa_C99S y pglN_PcpcB_natR que han sido cortados con <i>XbaI-XhoI</i> , generándose del plásmido pET28_SBPasa_C99S un fragmento de 1311 pb que se ligó con el plásmido pglN_PcpcB_natR.
glnN_PcpcB+His_slr2094_C75S-C84S	Ap Nat	Plásmido derivado de pET28_SBPasa_C84S_C75S y pglN_PcpcB_natR que han sido cortados con <i>XbaI-XhoI</i> , generándose del plásmido pET28_SBPasa_C84S_C75S un fragmento de 1311 pb que se ligó con el plásmido pglN_PcpcB_natR.
pET28_AtSBPasa	Km	Plásmido derivado de pET28 que contiene la región de 1022 pb amplificada por PCR con los oligos 265-264 de DNA _c de <i>A. thaliana</i> cedido por el laboratorio de F.J.Cejudo. Tras la amplificación tanto el plásmido como el inserto han sido cortados con <i>XhoI</i> y <i>NdeI</i> , generándose un fragmento de 1008 pb y el plásmido pET28 linealizado. Posteriormente tanto el inserto como el plásmido se ligaron.
pNRSD_PcpcB_hisAtSBPsa	Ap Km	Plásmido derivado de pET28_AtSBPasa y pPlat_nrsD_PcpcB_Kmv3R donde ambos fueron cortados con <i>XbaI</i> y <i>XhoI</i> . De esto se generó un fragmento de 1106 pb del plásmido pET28_AtSBPasa que se ligó con el plásmido pPlat_nrsD_PcpcB_Kmv3R linealizado.
pglnN_FBPasa_guisante	Ap Nat	Plásmido derivado de pAMC100 y pglN_PcpcB_natR donde ambos fueron cortados con <i>XbaI</i> y <i>XhoI</i> . Del plásmido pAMC100 se generó un fragmento de 1211 pb que se ligó con el plásmido pglN_PcpcB_natR linealizado.

2. 2. Aislamiento y manipulación del DNA

2.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina descrito en (Sambrook et al., 1989). La lisis alcalina de las células se realizó en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y NaOH, eliminando tras esto las proteínas y el DNA cromosómico mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación.

El DNA plasmídico se precipitó usando etanol absoluto y se resuspendió en agua miliQ. Para eliminar el RNA de las muestras estas fueron tratadas durante 1 hora a 37 °C con RNasa A de páncreas bovino (Sigma Aldrich) a una concentración final de 20 µg/ml. Para aislar DNA plasmídico de alta calidad con el fin de secuenciarlo o transformar *E. coli* se utilizó el sistema comercial *GEL/ PCR Purification Kit* (*FavorPrep™*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Aislamiento de DNA genómico de cianobacterias.

El aislamiento de DNA de *Synechocystis* se realizó siguiendo el método descrito por (Cai y Wolk, 1990), que se basa en la rotura celular con perlas de vidrio. Las células de 50 ml de cultivo se recogen por centrifugación (2000 g, 4°C y 10 minutos) y se resuspenden en 400 µl de tampón T.1E 1X (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8). A la suspensión se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio de (Sigma Aldrich, 0.25-0.30 mm de diámetro) estériles, 400 µl de mezcla fenol (pH 8,0):cloroformo 1:1 (v/v) y 20 µl de SDS al 10% (p/v). Tras esto la suspensión celular se sometió a 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa y 1 minuto en hielo, posteriormente se centrifugó (16200 g, 4°C y 15 minutos) y el sobrenadante se sometió a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). En el caso de *Anabaena* las células se sometieron solamente a 5 ciclos de agitación:hielo. El DNA se precipitó a -20 °C con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de acetato sódico 3M (pH 5,2), tras lo cual se centrifugó a 16200 g a 4 °C por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó y se resuspendió en 50 µl de tampón T.1E 1X. Para eliminar el RNA se trató con RNasa A de páncreas bovino (Sigma Aldrich) a una concentración final de 20 µg/ml a 37 °C durante 1 hora.

2.3. Introducción de DNA exógeno en organismos.

2.3.1. Transformación de células de *E. coli*.

2.3.1.1. Transformación por choque térmico.

Las células competentes de la estirpe DH5α fueron adquiridas del Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja). Para transformarlas se mezcló el DNA transformante (con un volumen máximo de 20 µL) con 100 µL de células transformables descongeladas en hielo. La mezcla se incubó 15 minutos en hielo, se sometió a un choque térmico de 1 minuto a 42 °C y se incubó 1 minuto en hielo. Tras esto a las células se le añadió 1 ml de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se sembraron en medio LB sólido con los antibióticos adecuados para seleccionar los transformantes.

Cuando se emplearon plásmidos que permitían identificar clones recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, al medio se añadió IPTG 0,2 mM y X-gal 40 µg/ml. De tal forma que las colonias recombinantes presentaban color blanco.

2.3.1.2. Transformación por electroporación.

Las células electroporables de la estirpe BL21 fueron adquiridas del Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja). En el caso de la estirpe HB101 para conseguir estas células electroporables se inoculó 1 L de medio LB con una colonia de la estirpe bacteriana y esta se dejó crecer a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6. Tras esto el crecimiento del cultivo se paró enfriándolo en hielo 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 2000 g en frío (4 °C) durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante de estas células y las células precipitadas se resuspendieron en 100 ml de agua miliQ, siendo posteriormente centrifugado a 1600 g empleando la misma temperatura y el mismo tiempo que en el caso anterior. Este paso de lavado con agua miliQ y centrifugación se repitió una vez más. Por último, las células se resuspendieron en 950 μ L de agua miliQ a la que se le añadió 200 μ L de glicerol y se distribuyeron en alícuotas de 100 μ L. Las células electroporables, para su transformación, se mezclaron con el DNA purificado (1-2 μ g de DNA en un volumen máximo de 5 μ L) con 100 μ L de las mismas durante 5 minutos en hielo; tras esto se pasó la mezcla a una cubeta tipo Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad) con 2 mm de separación entre electrodos para someterlas a su electroporación en un electroporador MicroPulser (Bio-Rad). Inmediatamente después se añadió 1 ml de LB a las células y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, las células se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes.

2.3.1.3. Expresión de proteínas en *E. coli*.

Para la expresión de proteínas se ha utilizado un sistema de expresión heteróloga en *E. coli* basado en el promotor del fago T7 (plásmido pET28 de Novagen). Para expresar estas proteínas se empleó la estirpe BL21 ya que portan la secuencia codificante para la RNA polimerasa de este fago bajo el control del promotor lacUV5. Las células se cultivaron a 37 °C en medio LB con el antibiótico adecuado hasta una DO_{580nm} de 0,3-0,6. A continuación se enfrió el cultivo en hielo y se indujo la expresión del gen con la adición de IPTG (0,1 mM). Los cultivos se mantuvieron 17-20 horas a 25 °C antes de recogerlas según el apartado 1.3.

2.3.2. Transformación de células de *Synechocystis*.

Synechocystis presenta un sistema natural con el que es capaz de incorporar a la célula moléculas de DNA que se encuentran en el medio (Grigorieva y Shestakov, 1982). Si este DNA presenta similitud con alguna secuencia del genoma además se integrará mediante recombinación homóloga.

El método de transformación se basa en el método descrito por (Chauvat et al., 1986). Se cultivaron 50 ml de células a los que cada día, durante 3 días, se les renovó el medio BG11c para mantenerlo en fase exponencial. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{750nm} de 0,5 las células fueron recogidas por centrifugación (2000 g, 10 minutos) y fueron lavadas 2 veces con medio BG11c estéril para eliminar posibles nucleasas extracelulares. Tras esto se resuspendieron en 1 ml de medio BG11c

estéril, distribuyéndose en alícuotas de 200 μ l en tubos de poliestireno-cristal de 10 ml de Soria Greiner S.A. junto a 2 μ g de DNA purificado. La mezcla de ambos fue incubada durante 2-3 horas a 30 °C y 50 μ E m⁻²·s⁻¹ de luz, tras lo cual se sembró en placas de Petri con medio BG11c sólido sobre filtros IMMOBILON-NC 85 mm de Whatman™ Millipore. Tras 20 horas en condiciones estándar de cultivo los filtros se transfirieron a placas de Petri con el antibiótico adecuado. Cuando se obtuvieron colonias resistentes (tras 7-10 días) estas se pasaron a placas nuevas de BG11c con el antibiótico adecuado y de ser necesario, para favorecer la segregación, se aumentó la concentración del antibiótico.

2.3.3. Transferencia de DNA a *Anabaena* por conjugación triparental.

Este proceso en el que participan dos estirpes de *E. coli* y *Anabaena*, se realiza mediante un protocolo de conjugación triparental basado en el uso de un plásmido conjugativo de amplio espectro (Elhai y Wolk, 1988). Una de las estirpes de *E. coli*, la estirpe HB101, porta el plásmido cargo (plásmido que se desea transferir a *Anabaena*, contiene la secuencia génica que quiere introducirse) que cuenta con un origen de transferencia conjugativa denominado sitio *bom* (basis of mobilization). Además, esta estirpe porta el vector auxiliar pRL623. pRL623 contiene el gen *mob* que codifica para la endonucleasa que reconoce y corta en el sitio *bom* de plásmido cargo, esto será esencial para la movilización. Además, pRL623 contiene genes que codifican para metilasas de sitios Aval, Avall y Avalll. (Elhai et al., 1997). Las metilasas protegen al plásmido cargo de las endonucleasas de restricción de *Anabaena*, evitando que se degrade al introducirse en la cianobacteria. Por otro lado, la otra estirpe de *E. coli* (ED8654) porta el plásmido conjugativo pRL443 (Elhai y Wolk, 1988) con los genes para movilizar el plásmido cargo hacia *Anabaena*.

Para llevar a cabo la conjugación la estirpe HB101 se transforma con el plásmido cargo siguiendo lo descrito en 2.3.1.1. Tanto este cultivo como la otra estirpe de *E. coli* se inoculan e incuban a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 12-15 horas. Para que ambas estén en fase exponencial para la conjugación se toman alícuotas de 350 μ l de cada cultivo y se inoculan cultivos de 10 ml de medio LB con el antibiótico adecuado que se incuban a 37°C con agitación a 200 rpm durante 2,5 horas. A continuación, las células se recogieron y se lavaron dos veces mediante centrifugación y resuspensión suave con 10 ml de medio LB para eliminar los antibióticos. Tras esto se resuspenden suavemente en 5 ml de medio LB, combinándose ambas estirpes y se recogen por centrifugación para ser resuspendidas en 60 μ l de medio. La mezcla se incubó a 30 °C durante 2,5 horas y tras esto se combinaron con una suspensión celular de *Anabaena* (10 μ g de clorofila) en un volumen máximo de 200-300 μ l. La mezcla resultante se extendió sobre un filtro estéril IMMOBILON-NC 85 mm de Whatman™ Millipore que se encontraba en una caja Petri con medio BG11 suplementado con LB al 5% (v/v) y se incubaron a 30 °C a baja intensidad luminosa durante 2h; tras esto se incubaron a las condiciones habituales 18 h. Tras este tiempo los filtros se transfirieron a placas de Petri con medio BG11 y tras 24 horas pasaron a placas Petri con el antibiótico adecuado. Cada 2 días los filtros se pasaron a una nueva caja Petri igual a la anterior hasta que el fondo desapareció. Cuando se obtuvieron las colonias estas fueron pasadas a placas de Petri con el antibiótico adecuado.

Para la selección de clones mutantes que han incorporado el DNA transferido por doble recombinación con el genoma de *Anabaena* se utilizó un sistema basado en la letalidad condicional del gen *sacB* (Cai y Wolk, 1990). El plásmido cargo presenta este gen, el cual codifica para una levansacarasa que en presencia de sacarosa genera un compuesto letal para la cianobacteria. Por tanto, los recombinantes simples donde el vector se ha integrado en el cromosoma mueren en presencia de sacarosa, mientras que aquellos donde se ha producido una doble recombinación pierden el gen *sacB*. Para favorecer la segregación cromosómica de la mutación, las colonias se cultivan en líquido sin antibiótico y alícuotas de 1 ml se someten a una sonicación suave hasta obtener filamentos de 3-5 células. De estos cultivos sonicados se sembraron diluciones seriadas en placas de Petri con medio BG11 suplementado con NH₄Cl 3 mM, sacarosa 5% (p/v) y el antibiótico adecuado de ser necesario. Los dobles recombinantes serán aquellos resistentes a sacarosa, para asegurarlo se ensayaba su resistencia al antibiótico del plásmido cargo (Sp/St) ya que si se hubiera producido la doble recombinación debían ser sensibles al mismo.

2.4. Análisis y cuantificación del DNA.

2.4.1. Cuantificación de la concentración de DNA.

Tanto la concentración de DNA plasmídico como de fragmentos amplificados por PCR se determinó mediante un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.2. Electroforesis en geles de agarosa.

Se realizó siguiendo el método descrito en (Sambrook et al., 1989) empleando geles de agarosa al 0.8-1.50 % (p/v) preparados con tampón TBE 0.5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM y pH 8) y añadiendo RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution a la concentración recomendada por el fabricante. A las muestras se les añadió 1/10 del volumen de tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25% (p/v), xileno-cianol FF al 0.25 % (p/v) y glicerol al 50% (v/v) en agua destilada). Junto a las mismas, para determinar el tamaño del DNA, se utilizó el marcado 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen. La electroforesis tuvo lugar en aparatos Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad y se visualizó con un transiluminador Universal Hood II (Bio-Rad) con luz ultravioleta (302 nm) y un sistema Gel-Doc™ XR (Bio-Rad). Finalmente, los geles se fotografiaron con un equipo Digital Graphic Printer UP D-897 de Sony.

2.4.3. Extracción de DNA de geles de agarosa.

Para purificar DNA de los geles de agarosa las bandas se recortaron y el DNA se extrajo mediante un sistema comercial FavorPrep™ MicroElute GEL Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este mismo kit también se empleó para eliminar posibles contaminantes.

2.4.4. Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T-Personal 48 de Biometra empleando un volumen de 25 o 50 μ l. De forma que cada reacción contenía 2,5 U o 5 U de VELOCITY DNA Polymersase (Bioline), tampón VELOCITY 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs a final de 0,2 mM cada uno, 1,5 ng de DNA molde y 50 pmol de cada oligonucleótido específico.

El programa de amplificación generalmente consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C (5 minutos), seguido de entre 30-35 ciclos de reacción y un ciclo final de polimerización a 72 °C (5 minutos). Cada ciclo de reacción contaba con:

1. Etapa inicial de desnaturalización a 95 °C (1 minuto).
2. Etapa de renaturalización a una temperatura entre 50-65 °C ya que depende de la pareja de oligos empleada (1 minuto).
3. Etapa de polimerización a 72 °C (1 minuto por cada kilobase del fragmento a amplificar).

Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron según los apartados 2.4.2. y 2.4.3.

Para realizar PCR de colonias, con el fin de determinar la segregación de las diferentes estirpes de cianobacterias, la polimerasa empleada fue DreamTaq DNA polimerasa (ThermoFisher Scientific) (2,5 U) y el tampón utilizado fue tampón 1X DreamTaq. El resto de los procedimientos se ajustan al mismo protocolo anterior.

2.4.4.1. Generación de mutantes dirigidos mediante PCR.

En ocasiones esta técnica se empleó para generar mutantes donde la secuencia génica final amplificada difiere en un nucleótido de la secuencia base amplificada. Para esto emplean oligonucleótidos complementarios, de una longitud entre 15 y 20 pb, y complementarios a la región génica donde en su interior se ha alterado un codón/codones de la secuencia original hacia el aminoácido/aminoácidos que se usará para sustituir a ese aminoácido original. Con estos oligonucleótidos, y los que aparean con la secuencia 5' y 3' del gen original, se generan dos fragmentos de PCR que solapan por la región donde se ha alterado la secuencia génica. La reacción y reactivos empleados es igual a la del apartado 2.4.4. Tras la obtención de estos fragmentos se realiza otra PCR donde el molde serían ambos fragmentos (en igual proporción) y los oligonucleótidos empleados serán los de los extremos no solapantes empleados para amplificar cada uno de los fragmentos. El resto de los pasos del proceso serían los mismos que los de una PCR simple. Tanto los oligonucleótidos empleados para esto como los genes alterados durante este trabajo se recogen en la tabla 10.

Tabla 10. Genes alterados mediante PCR solapante.

Gen y residuo alterado	Pares de oligonucleótidos para cada reacción	Plásmido amplificado
<i>slr2094</i> C99S	Fragmentos generados por la amplificación de 254-142 y 255-142. Posteriormente ambos se unieron mediante su amplificación	pET28_slr2094 pET28_slr2094_C84S

	empleando los oligonucleótidos 142-142	
<i>slr2094</i> C75S	Fragmentos generados por la amplificación de 250-142 y 251-142. Posteriormente ambos se unieron mediante su amplificación empleando los oligonucleótidos 142-142	pET28_ <i>slr2094</i> _C84S pET28_ <i>slr2094</i> _C99S
<i>slr0241</i> M53A	Fragmentos generados por la amplificación de 280-256 y 279-257. Posteriormente ambos se unieron mediante su amplificación empleando los oligonucleótidos 256-257	pPHAB_Nat_petRP_WT
<i>slr0241</i> M58A	Fragmentos generados por la amplificación de 282-256 y 281-257. Posteriormente ambos se unieron mediante su amplificación empleando los oligonucleótidos 256-257	pPHAB_Nat_petRP_WT pPHAB_Nat_petRP_M53A
<i>slr0241</i> H150AH154A	Fragmentos generados por la amplificación de 284-256 y 282-257. Posteriormente ambos se unieron mediante su amplificación empleando los oligonucleótidos 256-257	pPHAB_Nat_petRP_WT

2.4.5. Manipulación enzimática del DNA.

Para la manipulación enzimática del DNA se siguió el método descrito por (Sambrook et al., 1989) empleando endonucleasas de restricción suministradas por Takara y New England Biolabs. Los extremos de vectores abiertos por restricción se desfosforilaron para evitar su religación, para esto se incubaron con una fosfatasa alcalina (Roche) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM durante 1 hora a 37 °C. Tras esto los fragmentos se purificaron siguiendo lo descrito en el apartado 2.4.3. Las ligaciones se llevaron a cabo mediante el uso de la ligasa de DNA del fago T4 (Promega). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.4.6. Secuenciación del DNA.

La comprobación de las secuencias de DNA se realizó mediante secuenciación automática en el servicio de secuenciación comercial de StabVida (Portugal).

2.4.7. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) de fragmentos de DNA.

El DNA sintetizado para los distintos promotores a evaluar se obtuvo siguiendo las indicaciones señaladas en la Tabla 7 y el método descrito en el apartado 2.4.4. Tras esto el DNA se dirigió con la enzima de restricción *Sa*II y se marcó con [α -³²P]-dCTP (3000 Ci mmol⁻¹) empleando Sequenase v2.0 (Affymetrix). Tras esto la reacción de unión de PetR con los promotores se realizó en un volumen final de 20 μ L que

contenía 4 ng del DNA marcado y 4 µg de DNA de esperma de salmón en 20 mM Tris HCl (pH 8), 150 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glicerol diferentes cantidades de PetR purificada. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente tras lo cual se cargaron en un gel no desnaturante de poli(acrilamida) 6 % (acrilamida:bisacrilamida 30:0,6).

La electroforesis se realizó a 4 °C y 200V en 0,25X TBE. Tras la electroforesis el gel se transfirió a un papel Whatman 3 MM, se secó y autorradiografió empleando un Cyclone Phosphor System (Packard).

2.4.8. Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA usados como sondas se obtuvieron por PCR usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 7 y los plásmidos de la Tabla 8 y Tabla 9 adecuados. Los fragmentos se purificaron siguiendo lo descrito en los apartados 2.4.2. y 2.4.3. Para el marcaje se utilizó el sistema comercial Amersham Rediprime™ II DNA Labeling System (GE Healthcare) de extensión de cebadores aleatorios, según las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 100 ng de DNA desnaturado se marcó radioactivamente usando 20 µCi de 5' [α -³²P]dCTP (3000 mCi/mmol) en un volumen de 50 µL. Tras una incubación de 1 hora a 37 °C los nucleótidos que no habían sido incorporados se eliminaron con la filtración de las muestras en columnas Illustra™ MicroSpin™ S-200 HR columns (GE Healthcare). La diferencia en el marcaje se estimó mediante la cuantificación de la radioactividad de 1 µL de la muestra con un contador de centelleo Beckman LS 2800.

2.5. Análisis y cuantificación del RNA.

2.5.1. Tratamiento del material.

Para evitar la degradación del RNA con RNAsas el material empleado se sometió a diferentes tratamientos. Las soluciones usadas se prepararon con agua MilliQ tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0,1% durante 16 horas a 37 °C, posteriormente se autoclavó para inactivar el DEPC. El material de vidrio se esterilizó por calentamiento en un horno JP de Selecta a 200 °C durante 2 horas. El material de plástico fue tratado con H₂O₂ (33% v/v) durante 10 minutos o autoclavado. Todos los productos utilizados eran libres de RNAsas y los procesos se llevaron a cabo en frío.

2.5.2. Aislamiento de RNA total de *Synechocystis*.

Para el aislamiento de RNA de estas cianobacterias se empleó el método desarrollado por (García-Domínguez y Florencio, 1997). Se recogieron aproximadamente 30 U DO_{750nm} en fase exponencial de crecimiento (1 U DO_{750nm}) por centrifugación (7800 g, 5 minutos y 4 °C) y se resuspendieron en 400 µl de tampón STET (NaCl 0,1 M, Triton X-100 al 5% (v/v), EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH 8). Para la rotura de las células se añadieron perlas de vidrio de 0.45-0.6 mm de

diámetro (Sigma Aldrich) tratadas previamente con agua regia y horneadas, y 400 µl de fenol (pH 4,5):cloroformo 1:1 (v/v). Esta mezcla se sometió a 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa y 1 minuto en hielo y posteriormente se centrifugó (16200 g, 15 minutos y 4°C) y el sobrenadante se trató, como mínimo, tres veces con una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) para así eliminar las proteínas. El DNA y RNA se precipitaron con LiCl 0,5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante, como mínimo, 2 horas a -20 °C. El precipitado se secó y fue resuspendido en agua tratada con DEPC y se trató con Turbo DNase (Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se sometió de nuevo a una extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y el RNA se precipitó con acetato de sodio 0,1 M y etanol absoluto. El precipitado se resuspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC.

2.5.3. Cuantificación del RNA aislado.

La concentración de RNA de las muestras se determinó con un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.4. Electroforesis de RNA.

El RNA cianobacteriano aislado se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), preparado en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 20 mM, pH 7, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM) en presencia de bromuro de etidio (1 µg/ml) y formaldehído 6.5%. Las muestras cargadas en este gel contenían entre 5-10 µg de RNA en tampón MOPS 0,5X, formaldehído al 6,5% (v/v) y formamida desionizada al 50%. Todo esto en un volumen de 27 µl. Estas muestras se incubaron a 65 °C durante 15 minutos para que el RNA fuera desnaturalizado y tras esto se les añadió 3 µl de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25 % (p/v), xileno-cianol FF al 0,25 % (p/v) y glicerol al 50% (v/v) en agua destilada). La electroforesis se realizó durante 35-40 minutos a 90 V en tampón MOPS 1X.

2.5.5. Detección del RNA_m mediante hibridación RNA-DNA (Northern blot).

Tras lo descrito en el apartado 2.5.4. el gel se lavó tres veces durante 15 minutos con agua tratada con DEPC en agitación suave, tras esto se equilibró dos veces con SSPE 10X (1,5 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 10 mM EDTA) 20 minutos cada una de ellas con agitación suave. Posteriormente el RNA del gel se transfirió a membranas Immobilon-NY+ (Millipore) empleando un aparato de transferencia por vacío Trans-Vac™ TE80 (Hoefer Scientific Instruments) y tampón SSPE 10X durante 2 horas como mínimo. Tras la transferencia el filtro se horneó durante 10-15 horas a 70 °C. Posteriormente se realizó la prehibridación de los filtros con la solución de hibridación (fosfato sódico 0,5 M, pH 7,2, EDTA 10 mM y SDS 7% (p/v)) a 65 °C durante 30 minutos, tras esto fueron incubados con las sondas radioactivas deseadas entre 15-20 horas (Tabla 11). Posteriormente el filtro se lavó a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 minutos a 65 °C con solución de lavado (fosfato sódico 40 mM, pH 7,2 y SDS 1% (p/v)). Para revelar la señal radioactiva se emplearon pantallas de autorradiografía y un escáner Cyclone Storage Phosphor System. Como control de carga se empleó una sonda

del gen *rnpB* que codifica para la subunidad de RNA de la RNAsa P y que se expresa constitutivamente en las condiciones de experimentación (Vioque, 1992),

Tabla 11. Sondas usadas en la detección mediante marcaje radioactivo.

Sonda	Características más relevantes
<i>copM</i>	Mediante PCR con los oligos 389-390
<i>petE</i>	Mediante PCR con los oligos 172-173
<i>slr0601</i>	Mediante PCR con los oligos 275-276
<i>petJ</i>	Mediante PCR con los oligos 174-175
<i>rnpB</i>	Mediante PCR con los oligos 178-179
<i>slr0602</i>	Mediante PCR con los oligos 274-275

2.5.7. Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq).

Para la secuenciación del transcriptoma se emplearon muestras de RNA obtenidas según lo descrito en el apartado 2.5.2. de las que se analizó la calidad mediante el cálculo del algoritmo RNA Integrity Number o RIN con el equipo Bioanalyzer Agilent 2100 del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Para eliminar el RNA_R de las muestras se usó el el kit Ribo-Zero Magnetic para bacterias (Illumina), realizado por el personal de StabVida (Portugal). La secuenciación también fue realizada por el equipo de StabVida empleando un secuenciador Illumina HiSeq 4000 utilizando lecturas pareadas o paired-end de 150 pares de bases, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. Métodos bioquímicos.

3.1. Preparación de extractos celulares.

3.1.1. Rotura con perlas de vidrio.

Se centrifugaron distintos volúmenes de cultivo en tubos de 1,5, 2, 15 o 50 ml y el precipitado se resuspendió en un volumen de 300 µl del tampón adecuado (50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA para *Synechocystis* y 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol para *Anabaena*) con 0,5 ml de perlas de vidrio (0.25-0.30 mm de diámetro, Sigma Aldrich). A las muestras, salvo en el caso donde la actividad proteasa no quiera ser inhibida, se les añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 1 mM de concentración final. Las células se rompieron sometiéndolas a dos ciclos de 1 minuto de agitación en Minibeadbeater (Biospec Products) y 5 minutos en hielo. Posteriormente las perlas de vidrio fueron separadas mediante una centrifugación situando los Brand™ Microcentrifuge Tubes with Attached Screw Caps con las muestras sobre tubos Eppendorf (387 g, 3 minutos a 4 °C). Posteriormente se sometió a una centrifugación (1550 g, 5 minutos a 4 °C) para eliminar los restos celulares y, en caso de que se quisiera separar el extracto crudo de las membranas, a otra centrifugación (16200 g, 5 minutos a 4 °C).

3.1.2. Rotura por ultrasonidos.

Este método se empleó para obtener extractos de *E. coli* BL21 que expresase distintas proteínas. Para esto los cultivos se recogieron por centrifugación según el apartado 1.3. resuspendiéndose en el tampón adecuado (Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 300 mM y 5 mM imidazol) con PMSF a una concentración final de 1 mM. Las suspensiones, mantenidas en hielo, fueron sometidas a ciclos de ultrasonidos con un sonicador modelo S450D de Branson con un 30% de amplitud, estos ciclos fueron 4 de 20 segundos de ultrasonido con 40 segundos de intervalo entre ellos. Finalmente, la muestra se centrifugó (75600 g, 30 minutos a 4 °C) y el sobrenadante constituye el extracto crudo.

3.1.3. Preparación de muestras con células enteras

Las muestras preparadas con células enteras se emplearon para aquellas proteínas cuya estabilidad se veía alterada ante la rotura celular (PetR). Para esto 1 U DO_{750nm} del cultivo se recogió por centrifugación. De forma que el precipitado se resuspendió en 100 µl de tampón de carga de proteínas 1X (Tampón Tris-HCl 31,25 mM (pH 6,8), glicerol 5% (v/v), SDS 0,1% (p/v), 2-mercaptoetanol 2,5% (v/v) y azul de bromofenol al 0.000625% (p/v)) y se hirvió durante 10 minutos a 100 °C.

3.2. Cuantificación de proteínas.

La determinación de la cantidad de proteína se realizó por tres métodos diferentes:

1. Siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo de Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una proteína comercial de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich) para crear una recta patrón.
2. Usando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher) y el coeficiente de extinción calculado con ProtParam tool para la proteína cuya concentración se quiere conocer. Esto solo se utilizó para proteínas puras.
3. Para determinar las proteínas totales en células o en las membranas se empleó el método de Lowry (Lowry et al., 1951) con las modificaciones descritas por Markwell (Markwell et al., 1978).

3.3. Electroforesis de proteínas

3.3.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

La separación analítica de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes basados en el sistema de (Laemmli, 1970) como se describe en (Sambrook et al., 1989) utilizando aparatos Mini-Protean 3 Cell o Tetra Cell (Bio-Rad). Los geles presentaban un gel de concentración (parte superior) y un gel de separación (parte inferior). Como eran desnaturizantes tanto el tampón como los geles contenían el detergente dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% (p/v).

Los geles de separación se prepararon en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) y con una concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) de entre 10 y 15 % (p/v). Los geles de concentración se prepararon en Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) y una concentración de poliacrilamida del 4% (p/v). En ambos como catalizador de la reacción de polimerización se añadió persulfato amónico (APS) al 0,7% y N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamida (TEMED) al 0,1%. A las muestras se les añadió tampón de carga de proteínas 1X. Cuando se realizó en condiciones reductoras, se mezclaron con el tampón anterior que contenía 2-mercaptoetanol 10% (v/v) o DTT 100 mM. En cualquier caso, las muestras se desnaturalizan a 100 °C durante 10 minutos. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente a 150 o 200 V y la duración dependió de la masa molecular de las proteínas. Como marcador de proteínas para conocer la masa molecular se empleó Unstained SDS-PAGE standards Low Range (Bio-Rad).

3.3.2. Tinción con Coomasie.

Para realizarla los geles se sumergieron en una solución de azul de Coomasie (Brilliant Blue R-250 de Sigma Aldrich 0,1% (p/v), ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v) en agua) durante como mínimo 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras esto los geles de poliacrilamida se lavaron con solución desteñidora (metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) repetidas veces hasta alcanzar el grado de tinción deseado.

3.4. Inmunodetección de proteínas en membrana (Western Blot).

Tras separar las proteínas mediante electroforesis siguiendo el apartado 3.3.1., pero empleando un patrón preteñido Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad), las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium 0.45 µm de Bio-Rad). Para la transferencia se empleó un sistema de transferencia tipo semiseco TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit (GE Healthcare) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El tiempo de transferencia fue de 60 minutos a temperatura ambiente, empleando una intensidad de 0,8 mA·cm² y con un voltaje máximo de 20 V. Tanto el gel como la membrana se humedecieron en tampón de transferencia (Tris-HCl 49,4 mM, glicina 39 mM, pH 8,3, SDS 1,3 mM y metanol 20% (v/v)). La eficiencia del proceso se comprobó por la transferencia del marcador a la membrana. Además, la correcta transferencia de las proteínas se visualizó mediante tinción de proteínas con rojo Ponceau que se eliminó mediante lavados con agua. Posteriormente la membrana se incubó durante 1 hora en agitación suave con solución de bloqueo compuesta por leche desnatada en polvo de la casa comercial AppliChem (PANREAC) al 5% (p/v) y Tween-20 al 0,1% (v/v) diluido en tampón PBS (NaCl 26 mM, KCl 0,54 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, KH₂PO₄ 0,352 mM). Tras esto se incubó con el correspondiente anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 10-12 horas en agitación a 4 °C. Las diluciones de los anticuerpos se recogen en la Tabla 12. La membrana se lavó 4 veces durante 10 minutos con solución de lavado (tampón PBS, Tween-20 0,1% (v/v)) y se incubó en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora. Normalmente, este era anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich), pero en el caso del anticuerpo primario anti-

histidinas el anticuerpo secundario fue Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (Sigma). En ambos casos la dilución empleada fue 1:25000. La membrana volvió a ser lavada. Para detectar la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario se usó el kit comercial Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 12. Anticuerpos primarios, dilución de los mismos empleada y peso molecular de sus dianas.

Anticuerpo Primario	Dilución empleada	Peso molecular de las proteínas
α-GSI	1:250000 (extracto) 1:20000 (células)	52,95 KDa
α-FBP/SBPasa	1:25000	37 KDa
α-FBPasa	1:25000	38,2 KDa
α-FBPasa guisante	1:25000	45,5 KDa
α-TrxF	1:20000	19 KDa
α-His	1:1000	43 KDa (SBPasa) 45,5 KDa (FBPasa)
α-PetR	1:4000	15,8 KDa
α-PetE	1:4000	13,1 KDa
α-PetJ	1:4000	12,4 KDa
α-CopM	1:7000	22,5 KDa (forma citosólica) 20,2 KDa (forma periplásmica)

3.5. Purificación de proteínas.

Las proteínas purificadas utilizadas en este trabajo mediante cromatografía de afinidad y, posteriormente, filtración en gel se recogen en la Tabla 13. Las proteínas empleadas en este trabajo, pero no purificadas, están indicadas en la Tabla 14.

3.5.1. Cromatografía de afinidad por níquel.

Para el uso de esta técnica las proteínas fueron etiquetadas con una secuencia de seis histidinas en su extremo amino terminal. Su purificación se llevó a cabo a partir de extractos de BL21 mediante cromatografía manual de afinidad por níquel utilizando una resina tipo Sephadex His bind (IBA) que se empaquetó en columnas de plástico Poly-Prep Chromatography Columns de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad) tras añadir 4 ml de matriz. Las columnas fueron lavadas con 5 volúmenes de agua destilada para eliminar los posibles restos y se equilibraron 15 ml de tampón 50 mM de Tris-HCL pH 8, 300 mM de NaCl y 5 mM de imidazol. A continuación, se añadió el extracto crudo que una vez pasado por la columna volvió a ser pasado para favorecer la correcta interacción de toda la proteína etiquetada con la matriz. El eluato constituyó la fracción no unida. La columna se lavó con 5 volúmenes del mismo tampón anterior para eliminar restos no unidos (lavado 1); tras esto se lavó con 5 volúmenes de tampón 50 mM de Tris-HCL pH 8, 300 mM de NaCl y 50 mM de imidazol para eliminar proteínas unidas no fuertemente a la resina (lavado 2). Finalmente se añadieron 4 volúmenes de tampón 50 mM de Tris-HCL pH 8, 300 mM

de NaCl y 250 mM de imidazol para eluir la proteína unida a la matriz. Recogiéndose las distintas fracciones.

3.5.2. Cromatografía de exclusión molecular.

Tras realizar la cromatografía de afinidad las fracciones enriquecidas en las proteínas de interés se sometieron a una filtración en gel preparativa llevada a cabo en columnas PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma que las columnas se equilibraron con 30 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) NaCl 150 mM. Y posteriormente se añadió 2,5 ml de la muestra con la proteína deseada. Tras esto se añadió 3,5 ml de tampón en dos ocasiones, en la primera elución de 3,5 ml se encuentra la enzima sin contaminantes.

Tabla 13. Proteínas purificadas en este trabajo desde BL21.

Proteína	Plásmido	Características de la proteína recombinante
FBP/SBPasa	pET28_slr2094	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal.
FBP/SBPasa C75S	pET28_slr2094_C75S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBP/SBPasa C84S	pET28_slr2094_C84S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBP/SBPasa C99S	pET28_slr2094_C99S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBP/SBPasa C75SC84S	pET28_SBPasa_C84S_C75S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBP/SBPasa C75SC99S	pET28_SBPasa_C99S_C75S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBP/SBPasa C84SC99S	pET28_SBPasa_C84S_C99S	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal
FBPasa cloroplastídica de <i>Pisum sativum</i>	pAMC100	(Serrato et al., 2018)
SBPasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	pET28_AtSBPasa	Contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal

Tabla 14. Proteínas utilizadas que no han sido purificadas.

Proteína	Referencia
TrxA	(Mata-Cabana et al., 2007)
TrxB	(Pérez-Pérez et al., 2009b)
TrxQ	(Pérez-Pérez et al., 2009b)
FBPasa	(Gómez Romero, 2015)
PetR-GST	(García-Cañas et al., 2021)

3.6. Oxidación o reducción de proteínas purificadas.

En los casos donde se requiriese las proteínas purificadas según lo indicado en el apartado 3.5.1. se oxidaron de dos formas diferentes:

1. Oxidación con aire: las muestras de proteínas purificadas a una concentración de 1 mg/ml se sometieron durante 15 horas, a 4 °C, a agitación suave de forma que se oxidaron por el oxígeno del aire.
2. Oxidación con cobre (Cu²⁺): a las muestras de proteínas purificadas a una concentración de 1 mg/ml se les adicionó 50 μM de Cl₂Cu y esta mezcla se incubó durante una hora en hielo.

En aquellos casos donde fuera necesario reducir la proteína a un estado totalmente reducido a las muestras de proteínas purificadas a una concentración de 1 mg/ml se les añadió 10 mM de DTT y se incubó durante 1 hora en hielo.

3.7. Concentración de proteínas por ultrafiltración.

La concentración de proteínas purificadas se realizó con sistemas de filtración Millipore® UFC810096 Amicon® with Ultracel® 100 Regenerated Cellulose Membrane, NMWL: 30,000. Estos sistemas se lavaron con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) y NaCl 150 mM. Posteriormente se añadieron 2 ml de la muestra proteica a concentrar y se centrifugó a 387 g (4 °C) hasta quedar un volumen de 0,5 ml. Esta técnica se empleó tanto para concentrar como para eliminar proteínas contaminantes de menor peso molecular.

3.8. Alquilación de proteínas.

Para estudiar el estado redox de las proteínas *in vivo* se utilizaron agentes alquilantes que se unen a las cisteínas reducidas. Para ello a cultivos que se encontraban en fase exponencial y en diferentes condiciones de crecimiento se les añadía N-etilmaleimida (NEM) 10 mM uniéndose y bloqueando a los grupos tiol reducidos incrementando en 125 Da la masa molecular de cada cisteína. Tras una hora estas células se recogían por centrifugación (15700 g, durante 5 minutos a 4 °C). Posteriormente las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) que contenía NEM 10 mM y NaCl 50 mM y se rompieron según lo descrito en el apartado 3.1.1. El extracto crudo obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó durante 1 hora en hielo con TCA 10%. A continuación, se centrifugó a 15700 g durante 10 minutos (4 °C) y el precipitado (que contenía las proteínas) se lavó 3 veces con 1 ml de acetona fría tras lo cual se dejó secar y se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), SDS 2% y NaCl 50 mM y se separó en dos fracciones donde una de ellas contenía el doble del volumen que la otra. Esta última se trató con DTT 100 mM durante 1 hora en hielo y a la otra fracción se le añadió el mismo volumen de agua. Tras el tratamiento ambas fracciones se trataron con TCA 10% como en los pasos anteriores y posteriormente fue lavado con acetona fría. Los precipitados se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7) y SDS 2% y la fracción tratada con DTT se divide de nuevo en dos, a una se le añadió el agente alquilante, Metil-PEG-Maleimida (MM(PEG24)). Este compuesto incrementa en 1,24 kDa masa molecular de cada grupo tiol reducido (Figura 54A). Las muestras se mantienen a 4 °C durante 10-12 horas para el correcto funcionamiento del agente alquilante y a todas se les añadió glicerol 7,5%, y azul de bromofenol 0,01% para ser cargadas en geles de acrilamida SDS-PAGE.

4. Métodos biofísicos.

4.1. Evolución de oxígeno mediante el electrodo de Clark.

La producción y el consumo de oxígeno en *Synechocystis* se determinó mediante el uso de un electrodo de tipo Clark (Chlorolab 2+ System de Hansatech). Para esto se tomaron 0,5 U DO_{750nm} de células en fase exponencial en medio BG11c, BG11c-Cu+BCSA, BG11c+G o BG11c+G+DCMU y se les añadió 10 mM de NaHCO₃ previamente al inicio de las medidas. Para determinar la producción de oxígeno a diferentes intensidades luminosas se empleó un método donde las células se mantuvieron durante 4 minutos en oscuridad y posteriormente se les aplicaron intensidades crecientes (25, 60, 95, 120, 170, 245, 485, 1000, 1500 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) con una duración de 4 minutos cada una. Por otro lado, para determinar el consumo de oxígeno las células en las mismas condiciones se sometieron a 5 minutos de oscuridad, 15 minutos de luz de crecimiento y 60 minutos de oscuridad. Siendo este último dato el que corresponde al consumo de oxígeno.

5. Ensayos enzimáticos.

5.1. Determinación de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Esta actividad enzimática se determinó mediante la medida del fosfato liberado en la reacción en la que la fructosa-1,6-bisfosfato pasa a fructosa-6-fosfato por acción de la enzima. Para determinar el fosfato liberado de la reacción se hace reaccionar el mismo con el reactivo de Fiske-Subbarow ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,053 M, FeSO₄·7H₂O 0,30 M y 4% H₂SO₄ 9 N) generándose un compuesto azul cuya absorbancia se mide a 660 nm.

5.1.1. Determinación *in vitro* de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Para realizar estos ensayos se preparó una mezcla de reacción con MgSO₄·7H₂O 15 mM, tampón Tris-HCL pH 8 0,15 M y una cantidad variable de agente reductor, pudiendo ser este DTT y/o tiorredoxina (TrxA, TrxB, TrxQ) a la que se añadió 1 μg de enzima pura; de forma que el volumen final fuese de 175 μL . La mezcla permaneció en hielo durante 30 minutos para favorecer la total reducción de la enzima por los agentes reductores y tras esto se adicionó el sustrato de la reacción (fructosa-1,6-bisfosfato) a una concentración final de 15 mM. Tras la incubación a 30 °C durante 30 minutos la reacción se paró al añadir 1 ml de Fiske-Subbarow. Previamente a su medida se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para conocer la cantidad de Pi liberado se realizó una recta patrón de fosfato (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2 mM de fosfato) a la que se sometió al mismo proceso.

5.1.2. Determinación *in situ* de la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Para la realización de la medida con cultivos de distintas estirpes de *Synechocystis* se recogieron 4 muestras del mismo cultivo, cada una de 5 unidades de DO_{750nm}, y

se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 3500 g. Tras eliminar el sobrenadante las células se resuspendieron en tampón Tris-HCL pH 8 0,15 M con una concentración de MgSO₄.7H₂O variable. A dos de las muestras se les añadió DTT 10 mM, de forma que finalmente todas las muestras tengan un volumen final de 293 µL. Para permeabilizar las células se le añadió a cada muestra 7 µL de una mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio (MTA) al 20% (p/v) y se agitó en vórtex durante 5 segundos. Tras esto se añadió fructosa-1,6-bisfosfato 7,15 mM a una muestra con DTT y a otra muestra sin DTT y se incubó durante 30 minutos a 30 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13400 g durante 1 minuto y se tomó el sobrenadante de cada una; siendo este sobrenadante a lo que se añadió 2 ml de reactivo Fiske-Subbarow. Tras esto la mezcla se agitó con vórtex durante 10 segundos y se dejó reposar 15 minutos.

5.2. Determinación enzimática de glucógeno y glucosa extracelular

La cantidad de glucógeno intracelular se determinó siguiendo el método descrito en (Díaz-Troya et al., 2014) con modificaciones. Para ello se recogieron 2 ml de cada cultivo a medir y fue sometido a centrifugación (13400 g, 5 minutos a 4 °C) para eliminar el medio. Estos precipitados se lavaron tres veces con agua miliQ para eliminar posibles contaminantes. Tras esto las células se resuspendieron en 300 µl de acetato sódico 30 mM (pH 5,2) y se rompieron como en el apartado 3.1.1. pero sin la adición de PMSF. Tras eliminar las perlas de vidrio mediante centrifugación a baja velocidad cada muestra se hierva durante 20 minutos a 100 °C. De cada muestra se tomaron dos alícuotas de 100 µl, una de ellas se trató con 10 U de amiloglucosidasa de *Asperguillus niger* (Sigma Aldrich) y la segunda sin adición de amiloglucosidasa; todas las muestras se incubaron durante 12-15 horas a 55 °C. La glucosa liberada de cada alícuota se determinó mediante el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa (#GAGO-20 catálogo de Sigma Aldrich). Para determinar la cantidad exacta se realizó una curva patrón con glucógeno comercial, tratados con amiloglucosidasa e incubado con las muestras anteriores. La cantidad de glucosa liberada se determinó mediante la absorbancia a 540 y en cada par de muestras se restó la medida correspondiente a la muestra sin amiloglucosidasa.

Para determinar la glucosa extracelular de aquellos cultivos en mixotrofia y fotoheterotrofia se siguió el mismo proceso que el empleado para el glucógeno tras la incubación con amiloglucosidasa. En esta medida se realizó una recta de glucosa pura, en lugar de glucógeno, en concentraciones entre 0 y 0,35 µM.

5.3. Medida de la actividad proteasa de PetP

La medida de la actividad proteasa de PetP se ensayó tanto en cultivos de *E. coli* como en cultivos de *Synechocystis*. Los cultivos de *Synechocystis* en medio BG11c-Cu y los de *E. coli* en medio mínimo M9 (Neidhardt et al., 1974) suplementado con LB 0,1%. En ambos casos se recogieron 20 U DO y se resuspendieron en 300 µL de tampón 10 % glicerol, 1 mM Zn, 50 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH8, siendo tras esto sometidos al ciclo de rotura descrito en el apartado 3.1.1. Posteriormente se centrifugó a baja velocidad (1000 g) en frío, para eliminar las células enteras que pudieran continuar en la muestra. Tras esto se separan 130 µL de cada muestra en dos tubos distintos, a uno se le añade 0.5 µM de Cu²⁺ y al otro tubo se le añadió la

misma cantidad de tampón de rotura. Finalmente, a cada muestra se le añadió 2 µg de PetR-GST. Las muestras se incuban a 30 °C y se van tomando volúmenes iguales de ambas a diferentes tiempos de incubación, tras lo cual a cada una de estas muestras se les añade tampón de carga de proteínas 1X y se hierve a 100 °C durante 10 minutos.

6. Métodos bioinformáticos.

6.1. Obtención de las secuencias y análisis básico

Las secuencias de los genes y las proteínas analizadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>), de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y/o de ExPASy así como sus herramientas asociadas (<https://www.expasy.org/>). El cálculo del coeficiente de extinción de las distintas proteínas se realizó mediante la aplicación ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>). Para determinar la posible estructura de PetR se empleó SwissModel de ExPASy (<https://swissmodel.expasy.org/>). Para estudiar la familia a la que pertenecen proteínas de función desconocida se empleó InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Para calcular la cantidad de proteína relativa se empleó Image Lab Software (Bio-Rad) (<https://www.bio-rad.com/es-es/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>). Para determinar los parámetros cinéticos en base a curvas de Michaelis-Meten se utilizó GraphPad Prism versión 5.00 para Windows; GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com). Para la visualización de proteínas cuya estructura ya está descrita se empleó UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

La localización de dianas de restricción de DNA, así como fases de lectura o traducción de secuencias nucleotídicas a proteínas, se realizó con SerialCloner 2.6. La búsqueda de similitud de una secuencia nucleotídica o proteica de *Synechocystis* con secuencias de otros organismos existentes en bases de datos se realizó mediante la aplicación BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tras esto las secuencias se alinearon con el algoritmo "MUSCLE" incorporado en el programa MEGA 7.0.26. (Kumar et al., 2016) y posteriormente la conservación de residuos en estos alineamientos se calculó empleando ConSurf (Landau et al., 2005; Ashkenazy et al., 2016) y WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>). Para determinar la conservación de los residuos de los diferentes promotores bajo el control de PetR se empleó MEME (<http://meme-suite.org/>). Para determinar los diferentes dominios de la proteína PetP se empleó la herramienta online TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para estudiar los promotores de *petE* y *petJ* se empleó la base de datos MGcV (<http://mgcv.cmbi.ru.nl/>) y MEME (<http://meme-suite.org/>). En el caso de comprobar la co-presencia de varias proteínas se empleó STRING (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/STRING/>) (Szkarczyk et al., 2019).

7. Otros métodos analíticos.

7.1. Determinación de la concentración de clorofila.

La concentración de clorofila se determinó según el método (Mackinney, 1941) espectrofotométricamente. Para esto se tomó 1 ml de células, se centrifugó (12000 rpm durante 1 minuto) y se eliminó 900 μL de sobrenadante. En el sobrenadante sobrante se resuspendió el sedimento y se añadieron 900 μL de metanol absoluto. Esta mezcla se agitó durante 30 segundos en el vórtex y volvió a centrifugarse (3800 g durante 1 minuto). La concentración de clorofila se determinó del sobrenadante a 665 nm utilizando el coeficiente de extinción de $74.46 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2. Medidas espectrofotométricas.

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

7.3. Medidas de pH.

El pH de las distintas disoluciones se midió con un pH Meter Basic 20 (Crison) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

**A. Regulación del
intercambio citocromo
c₆/plastocianina mediada
por proteasa**

1. Análisis de la co-presencia con otros genes de *petE* y *petJ*.

Para intentar determinar cuál sería la posible proteína reguladora implicada en el cambio de expresión de citocromo (*petJ*) a plastocianina (*petE*) en respuesta a cobre se analizaron los genomas disponibles de 169 cianobacterias. De forma que, en dichas especies, se identificaron los genes que codifican para ambas proteínas (*petJ* y *petE*) utilizando BLAST. De esta forma se comprobó en qué estirpes estaban presentes ambos o solo uno de los transportadores, pues si solo una de las proteínas estaba presente el intercambio entre uno y otro no ocurriría. Posteriormente se buscaron reguladores transcripcionales que estuvieran relacionados con estas proteínas mediante el análisis de los genomas de las cianobacterias donde las dos estuvieran presentes, buscando por tanto reguladores que estuvieran conservados en estas especies. De forma que manualmente se realizó un análisis del genoma de estas cianobacterias y se determinó que existía un regulador transcripcional de la familia Blal, codificado por la ORF *slr0240* en *Synechocystis* (*petR*), que estaba presente en estas cianobacterias. Aguas abajo de este gen, y formando un operón con el mismo en todas las cianobacterias que presentan este regulador transcripcional, se encontraba el gen *slr0241* (*petP*) para *Synechocystis* que codifica para una proteasa tipo M48 (Figura 11A). El hecho de que el codón de STOP de *slr0240* solape con el ATG del gen *slr0241* sugiere que ambos se expresan como una misma unidad transcripcional, lo que señala que posiblemente estén implicados en un mismo proceso de regulación como ocurre con sus homólogos Blal-BlarR1 y MecI-MecR1 (Safo et al., 2005, 2006). Al analizar cianobacteria por cianobacteria la presencia o ausencia de los genes que codifica para el regulador y la proteasa, así como su contexto genómico, se determinó que en el 20% de las 169 cianobacterias analizadas los genes *petJ* y *petE* se encontraban adyacentes uno con respecto al otro (*Synechococcus*, *Cyanobium*, *Microcystis*, *Cyanothece*, *Pleurocapsa*, *Gloeocapsa* y algunos Nostocales entre otros) y que en el 40% de las mismas estos se encuentran adyacentes o cercanos a *petR* y *petP* (*Pseudoanabaena*, *Chroococciopsis*, *Gloeocapsa*, *Nodosilinea*, *Geitlerinema*, *Spirulina*, *Moorea Producentis*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* y *Microcoleus*) (Figura 11B). Sin embargo, el 18% de las cianobacterias analizadas que presentaban *petJ* y *petE* no contaban con el operón *petRP*, perteneciendo a los géneros *Synechococcus* o *Prochlorococcus*. Como se ha comentado anteriormente esta familia de factores transcripcionales y proteasas suelen estar implicadas en la regulación de la expresión de genes ante una determinada señal que induce la degradación del regulador mediada por la proteasa (Carretto et al., 2002; Llarrull et al., 2011; Llarrull y Mobashery, 2012). Esto unido al hecho de que estén correlacionados en cianobacterias con la plastocianina y el citocromo c_6 sugería una posible relación entre este sistema regulador-proteasa y el intercambio entre los transportadores electrónicos.

De esta forma se determinó que estas cuatro proteínas se encontraban en todos los grupos cianobacterianos a excepción de los clados *Synechococcus* y *Prochlorococcus*. En base a estos resultados se presupone que donde se produce este intercambio entre plastocianina y citocromo c_6 , de forma dependiente a la disponibilidad de cobre en el medio, también presentaba en su genoma los genes *petR* y *petP*.

Tree scale: 0.1

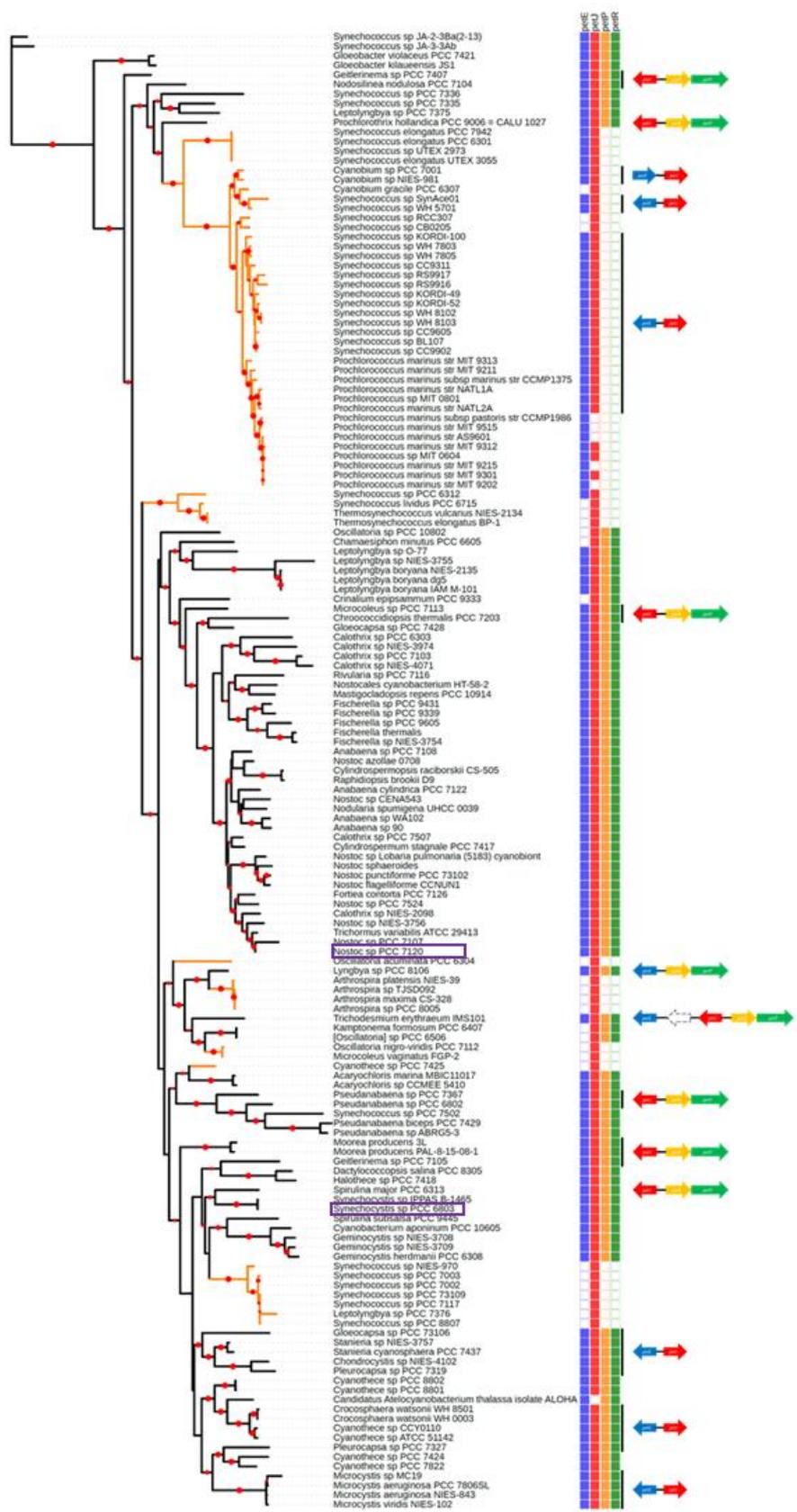


Figura 11. Distribución en las cianobacterias de los genes que codifican para *petR*, *PetP*, *petJ* y *petE*. Árbol filogenético basado en 16S de las principales cianobacterias junto a la representación de la co-localización de los genes *petJ* (rojo), *petE* (azul), *perR* (verde) y *petP*

(amarillo). Todos los Bootstrap se encuentran entre 70 y 100, cuanto mayor sea el diámetro del círculo rojo de cada nodo mayor será este valor. En morado aparecen remarcadas las cianobacterias *Synechocystis* y *Anabaena*.

2. Análisis funcional de los genes *petR* y *PetP* en *Synechocystis*.

2.1. Análisis *in silico* de la proteína PetR y su efecto en la regulación mediada por cobre.

Puesto que PetR es una proteína cuya función y estructura en cianobacterias es desconocida, a pesar de presentar similitud estructural con reguladores de sistemas bacterianos, se procedió a analizar bioinformáticamente las características principales de la misma. Para esto se introdujo la secuencia proteica de PetR, de *Synechocystis*, en InterPro, y se determinó que esta proteína pertenecía a la superfamilia Blal (Figura 12A). Además, se estableció que se trataba de una proteína soluble y la predicción de su estructura tridimensional, mediante SwissModel, determinó que probablemente se trataría de un homodímero, como Blal y MecI. De hecho fue Blal (Safo et al., 2005) la proteína empleada como modelo para obtener dicha predicción al ser la estructura establecida con mayor similitud en base a la secuencia.

Para determinar la posible aplicación de los estudios realizados sobre Blal/BlalR1 y MecI/MecR1 de bacterias a esta proteína se estudió la conservación de residuos importantes en los reguladores bacterianos mediante el análisis de estas secuencias de PetR de diferentes cianobacterias que presentaban PetR, PetP, Cit_{c6} y Pc. Las secuencias se alinearon y posteriormente se comprobó mediante ConSurf y WebLogo3 la conservación de los residuos (Figura 12B, 12C), puesto que el grado de conservación de residuos implicados en la función de las proteínas era alto en bacterias se esperaba lo mismo para cianobacterias. Esta proteína en algunas especies presenta un sitio de inicio de la traducción anterior al observado en la mayoría de las cianobacterias, este es el caso de algunas estirpes de *Nostoc*, *Mycrocystis*, *Calothrix*, *Leptolyngbia* y *Crocospaera*. El principal residuo conservado de interés es la fenilalanina F98 de *Synechocystis*, presente en todas las cianobacterias, ya que en Blal de *Staphylococcus* en esta misma posición se encuentra otro residuo de fenilalanina, se cree que es este residuo donde la proteasa corta al regulador (Peacock y Paterson, 2015). Además, destaca el alto grado de conservación de los triptófanos en la posición 15, 56 y 77 de *Synechocystis*. Puesto que el triptófano es uno de los aminoácidos menos representados en las proteínas de bacteria (Neidhardt et al., 1990), que una proteína pequeña presente 3 totalmente conservados es poco común.

2.1.1. Cambios en los niveles de Cit c₆, Pc y PetR en distintas concentraciones de cobre.

Ya que existe un cambio de la expresión de Cit c₆ hacia la expresión de Pc en presencia de cobre y viceversa (Zhang et al., 1992) se estudió cómo afectaban distintas cantidades de cobre a la expresión de estas proteínas así como a PetR (Figura 13). Para esto *Synechocystis* creció en medio BG11c-Cu y se analizó mediante Western Blot su respuesta tras la adición de cantidades crecientes de cobre (50, 100, 200 y 500 nM). Por tanto, se determinaron los niveles de las proteínas PetR, Pc, Cit c₆, CopM y Glutamina Sintetasa tipo I (GSI). GSI actuaba como control de carga ya que su expresión es independiente de la presencia o ausencia de cobre en el medio y CopM se acumula en respuesta a cobre con una forma procesada cuya acumulación aumenta al ser mayor la concentración de cobre (Giner-Lamia et al., 2015). En el caso de las muestras que se emplearon para conocer la acumulación de PetR se emplearon células enteras ya que en los extractos la cantidad de PetR de la estirpe silvestre disminuía con respecto a la cantidad de la misma cuando se empleaban muestras de células enteras. Posiblemente porque esta proteína, tras la lisis celular, se degrada parcialmente.

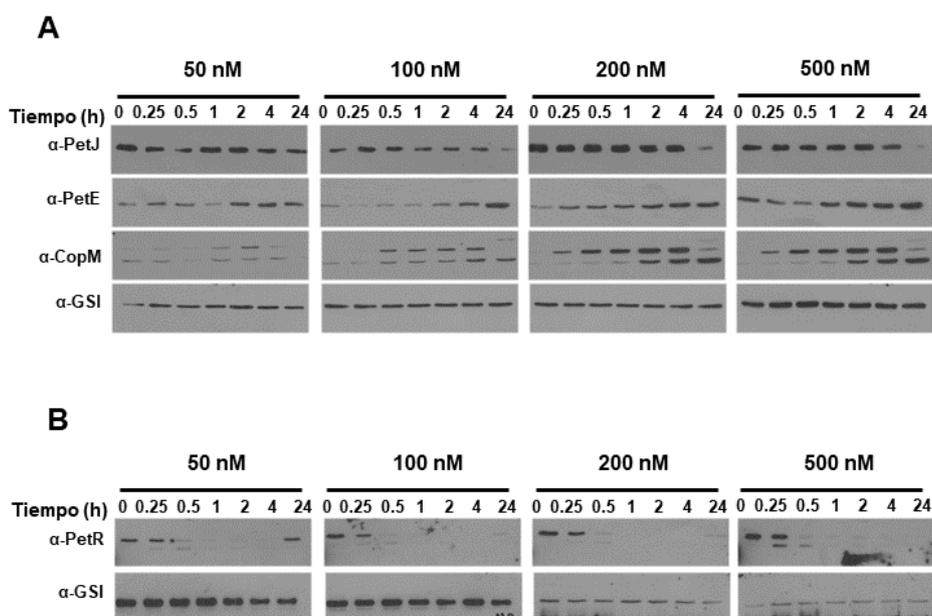


Figura 13. Acumulación en PetR, PetJ y PetE de forma dependiente de cobre. (A) Western blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en la estirpe WT (silvestre) cultivada en BG11c-Cu tras la adición de concentraciones crecientes de cobre (50, 100, 200 y 500 nM). Se cargaron 5 μ g de proteína de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(B)** Western blot de PetR y GSI en la estirpe WT (silvestre) tras la adición de concentraciones crecientes de cobre (50, 100, 200 y 500 nM). Tras esto las células fueron recogidas a los tiempos indicados y las células enteras fueron cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

A bajas concentraciones de cobre (50 y 100 nM) la cantidad de Cit c₆ apenas disminuía mientras que la inducción de Pc era pequeña (Figura 13A). En el caso de PetR, a todas las concentraciones de cobre empleadas, se observó cómo, tras 30

minutos de la exposición a cobre, la proteína desaparecía apareciendo previamente una doble banda indicativa de un probable corte específico en esta proteína y una posible degradación de la misma (Figura 13B). En aquellos cultivos a los que se les añadió 50 o 100 nM de cobre también se observó que PetR se recuperaba tras 24 horas de exposición a dicho metal (Figura 13B). Además, en 50 y 100 nM de cobre la inducción de CopM fue débil y poco apreciable tras 24 horas en relación a lo observado con 200 y 500 nM de cobre (Figura 13A). Todo esto indicaba que el cobre libre, y por tanto capaz de ser detectado por la célula, era bajo tras 24 horas de la adición de bajas concentraciones (50 o 100 nM). Debido a que en estos cultivos se observó una recuperación en los niveles de PetR (hasta unos niveles similares a los que se observaron en medio BG11c-Cu) tras 24 horas de exposición a 50 nM de Cu se especuló que fuera esta recuperación del regulador lo que impidiera una fuerte inducción de *Pc* o una fuerte represión de *Cit c₆* (Figura 13). Esta teoría se apoyaba en que en aquellas condiciones donde este efecto no se observó (200 nM y 500 nM) sí que se observaron cambios importantes en el citocromo *c₆* y la plastocianina. Puesto que la cantidad o presencia de PetR dependía de la concentración de cobre, posiblemente este regulador transcripcional se degrade ante una señal inducible por este metal. Por tanto, se podría establecer una relación entre el regulador y la expresión de estos genes. En todos los casos se produjo una inducción de la forma procesada de CopM lo que ratificaba que realmente el cambio producido se debía a la adición de cobre.

2.1.2. Generación de la estirpe PETR.

Con el fin de determinar una posible relación entre la proteína PetR y la respuesta a cobre que induce el paso de sintetizar *petJ* a *petE* se procedió a generar un mutante que careciese de la proteína PetR. Para ellos se transformó la estirpe silvestre con el plásmido pPETR_Sp en el que se ha insertado un gen de resistencia a espectinomicina/estreptomicina (Figura 14A); de esta forma se generó la estirpe PETR que no expresaba *petR*. La segregación de esta estirpe se verificó mediante PCR con oligonucleótidos que apareaban a ambos lados del sitio de inserción (Figura 14B).

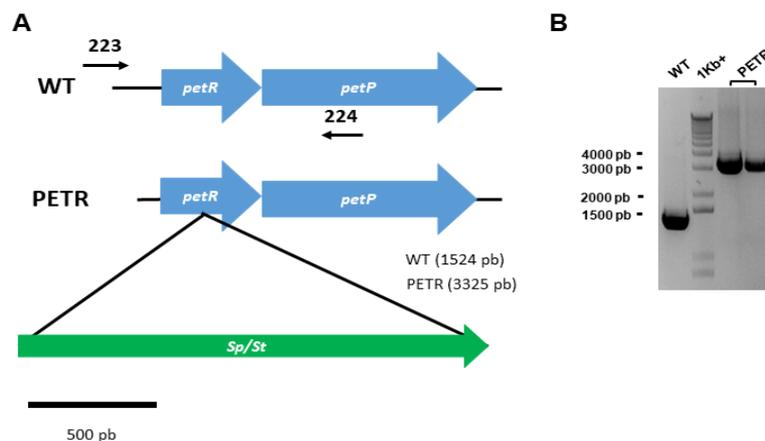


Figura 14. Generación y comprobación del mutante PETR. (A) Representación esquemática de la región genómica *petRP* de la estirpe WT (silvestre) y PETR. **(B)** Análisis mediante PCR y PETR. **(B)** Análisis mediante PCR y PETR de la segregación de PETR usando los oligonucleótidos 223-224.

2.1.3. Caracterización del intercambio citocromo c_6 /plastocianina en el mutante PETR.

Con el fin de determinar si la presencia o ausencia de cobre generaba un cambio en el patrón de expresión de la estirpe PETR se cultivaron tanto esta como la estirpe silvestre en medio BG11c-Cu y se analizó la expresión de *petJ*, *petE*, *copM* y *rnpB* (como control de carga), mediante Northern Blot, tras la adición de 500 nM de cobre (Figura 15A). Como en el caso anterior la sonda de *copM* se empleó para comprobar la adición de cobre. De esta forma se determinó que la respuesta a cobre en cuanto a la inducción de *copM* era igual en ambas estirpes, por lo que la relación de PetR en la respuesta a cobre no estaba relacionada con CopM. La respuesta en cuanto al intercambio de *petJ* a *petE* sí que se alteró en la estirpe PETR. En la estirpe silvestre tras la adición de cobre la expresión de *petJ* disminuía y la de *petE* aumentaba tal y como estaba descrito. Sin embargo, en la estirpe PETR esto no ocurrió, sino que únicamente se expresó *petE* independientemente del cobre en el medio. En ningún caso para esta estirpe se observó expresión de *petJ* (Figura 15A).

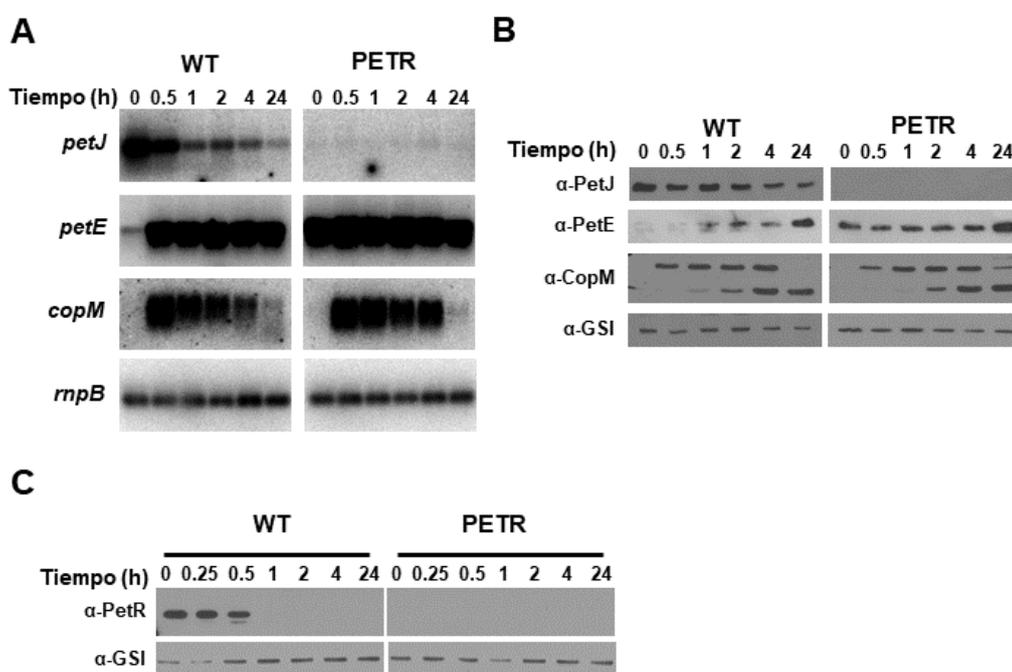


Figura 15. Análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y citocromo c_6 en respuesta a cobre en el mutante PETR. (A) Análisis mediante Northern Blot de *petE*, *petJ*, *copM* y *rnpB* en las estirpes WT (silvestre) y PETR cultivadas en BG11c-Cu en respuesta a la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Los filtros se hibridaron con las sondas para *petE*, *petJ* y *copM* y posteriormente, tras eliminar estas sondas, se rehibridó con la sonda de *rnpB*. **(B)** Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETR cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Se cargaron 5 μ g de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(C)** Western Blot de PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETR cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Tras esto las células enteras fueron cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Igualmente se analizaron en este mismo experimento los niveles de las proteínas Cit c₆, Pc, CopM y GSI mediante Western Blot (Figura 15B). Para la estirpe silvestre los resultados correlacionaron con los obtenidos en cuanto a la expresión génica, ya que aumentó la cantidad de Pc y disminuyó la de Cit c₆. De igual forma, en respuesta a cobre empezó a acumularse CopM, primero en su forma no procesada y posteriormente en su forma procesada (Giner-Lamia et al., 2015). En el caso de PETR se mantuvo la ausencia de Cit c₆ y la expresión constitutiva de Pc. Aunque en esta estirpe se acumuló Pc incluso en medio sin cobre parece haber una mayor acumulación de Pc tras 24h de la adición de cobre respecto a medio sin cobre (Figura 15B), pese a que los niveles de expresión del RNA de la misma eran constitutivos (Figura 15A). También se comprobó que la estirpe PETR carecía de PetR y, como en el caso anterior (Figura 13B), tras la adición de 500 nM de cobre en la estirpe silvestre la cantidad del regulador disminuye y en tiempos cortos (media hora tras añadir cobre) se presentó un doble bandeo por la aparición de una banda de menor peso molecular a PetR que indicaba que esta proteína posiblemente se procesaba mediante un corte en la misma (Figura 15C).

2.2. Análisis *in silico* de la proteína PetP y su papel en la regulación mediada por cobre.

Puesto que al igual que PetR la función en cianobacterias de PetP es desconocida se realizó una primera aproximación bioinformática para determinar su similitud con las proteasas de bacteria. Para esto se introdujo la secuencia de PetP de *Synechocystis* en InterPro, determinándose de esta forma que PetP pertenecía a la superfamilia de proteasas M48/M56 (familias PFAM PF01435 y PF05569) (Figura 16A). Además, a diferencia de PetR (Figura 12A), la predicción para esta proteína determinó la presencia de varias regiones transmembrana (Figura 16A). Estos datos unidos a los obtenidos para PetR (Figura 12) apoyarían la hipótesis de que PetP podría actuar sobre el regulador como ocurre en los sistemas de regulación bacterianos Blal/BlaR1-MecI/MecR1 (Carretto et al., 2002; Llarrull et al., 2011). Al ser una proteína con regiones ancladas a la membrana se analizó más profundamente mediante el programa bioinformático TMHMM, específico de proteínas de membrana, qué partes de la proteína estarían insertadas en la membrana y cuáles serían las regiones solubles (Figura 16B). De esta forma se determinó la presencia de cuatro segmentos transmembrana como ocurre con las proteasas M48 (Figura 16B), apoyando así los datos obtenidos por InterPro (Figura 16A). La principal región soluble de PetP, en base a estas predicciones, se encontraba entre el tercer y cuarto segmento transmembrana que contenía aproximadamente 154 residuos, por lo que las otras regiones solubles eran de menor tamaño. A diferencia de otras proteasas M48, PetP carece del gran segmento C-terminal soluble que en esta familia se encarga de alterar la estructura de las proteasas ante la señal de activación de las mismas.

Para profundizar sobre su similitud con los sistemas Blal/BlaR1 y MecI/MecR1 de bacterias se analizó la conservación de los residuos conservados en las proteasas bacterianas como son los aminoácidos de coordinación con zinc o los sitios de corte y reconocimiento. Así, se analizaron las secuencias de PetP de las cianobacterias que además presentaban PetR, Cit c₆ y Pc. Estas secuencias se alinearon y, posteriormente, se comprobó con ConSurf y WebLogo3 dicha conservación,

determinándose que los residuos implicados en la coordinación con zinc en PetP se encontraban conservados en todas las secuencias analizadas, por lo que presenta el motivo HEXXH entre las histidinas 150-154 (Figura 16C).

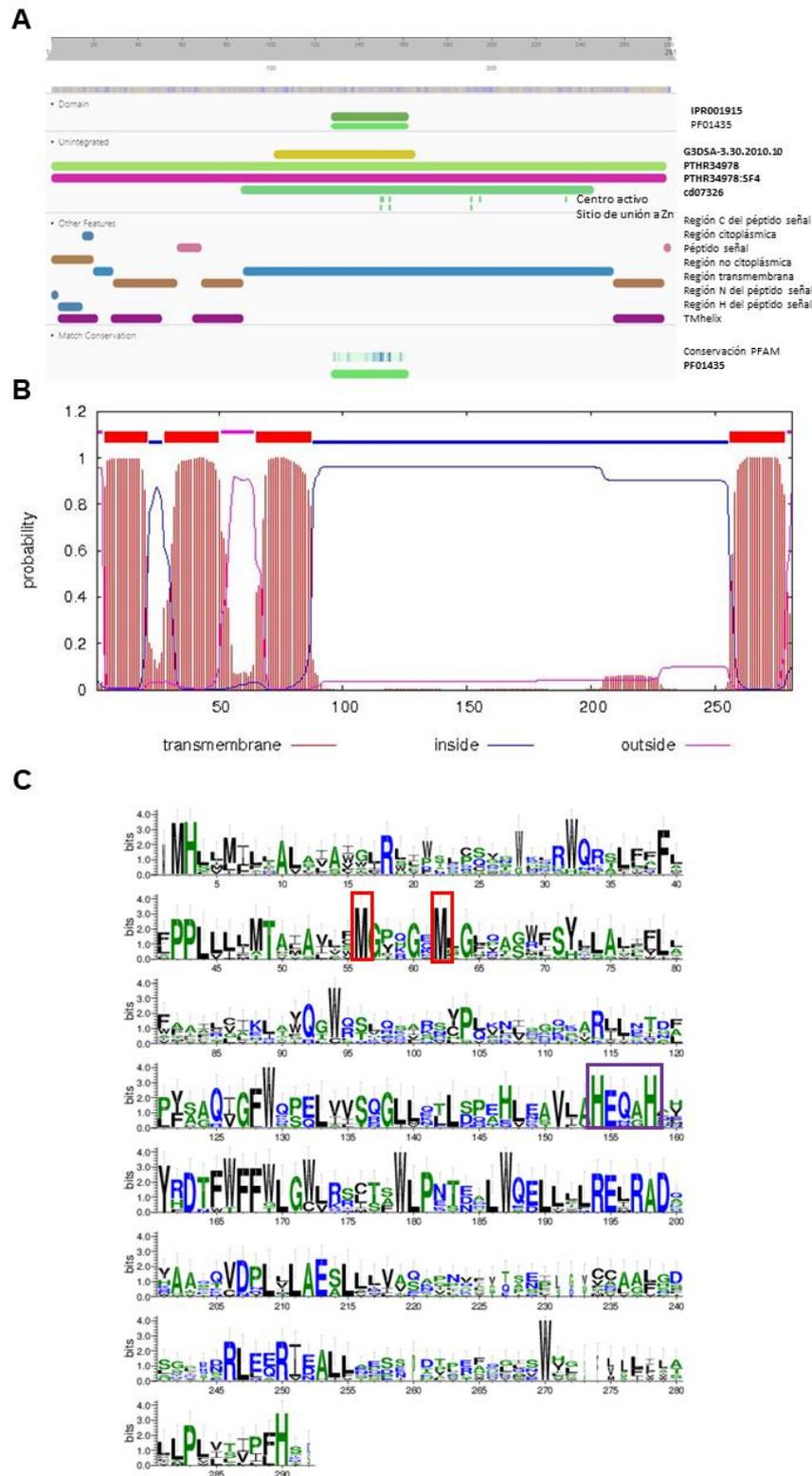


Figura 16. Características principales de PetP determinadas mediante análisis bioinformático. (A) Análisis empleando InterPro de la proteína PetP, determinando su familia funcional y su solubilidad. **(B)** Análisis empleando TMHMM de la proteína PetP, determinando que esta proteína presenta 4 segmentos transmembrana. **(C)** Determinación de la conservación

de residuos en PetP mediante el análisis de 260 secuencias de PetP cianobacterianas. Las secuencias se alinearon con MUSCLE y el grado de conservación se determinó mediante el uso de WebLogo3. En rojo están señaladas las metioninas 53 y 58 mientras que en morado se reseña el sitio de coordinación con zinc.

A pesar de que el sitio de corte autocatalítico típico de bacterias de la proteasa no parece estar conservado entre las diferentes proteasas cianobacterianas estas sí presentan secuencias altamente conservadas en el lazo que une el tercer y cuarto segmentos transmembrana que incluyen argininas como ocurre en BlaI/Mecl. Por lo que es posible que los residuos que rodean a estas argininas puedan ser distintos en bacterias y cianobacterias, de forma que este motivo podría estar alterado. Ya que si PetP fuera la proteasa implicada en el intercambio Cit_{c6}/Pc debería ser capaz de detectar cobre se analizó la conservación de residuos de metionina en la misma, puesto que varios estudios señalan a estos aminoácidos como los principales implicados en coordinar con cobre (Lu, 2003; Le Sueur et al., 2016). Así se determinó que presentaba dos metioninas altamente conservadas, M53 y M58 (Figura 16C). Por lo que estas metioninas podrían estar implicadas en la capacidad de detectar cobre de PetP y en la activación de su respuesta.

2.2.1. Generación de la estirpe PETA.

Para comprobar la posible implicación de esta proteasa en la degradación de PetR en respuesta a cobre y en el intercambio *petJ/petE* ante la presencia del mismo metal se generó la estirpe mutante PETA que no expresaba *petP*. Esta estirpe se generó mediante la transformación de la estirpe silvestre con el plásmido pPETA_Ery, donde el gen *slr0241* que codifica para la proteasa estaba interrumpido por un cassette de resistencia a eritromicina (Figura 17A). La segregación de esta estirpe se comprobó mediante PCR empleando los oligonucleótidos que aparean a ambos lados del operón *slr0240-0241* (Figura 17B).

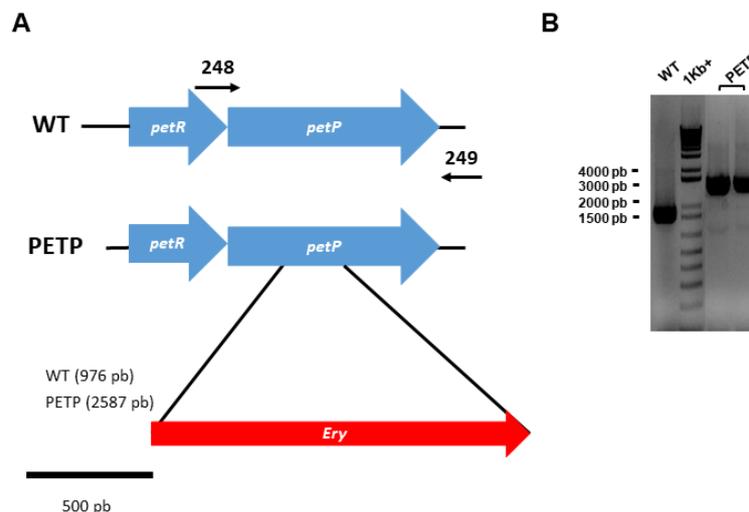


Figura 17. Generación y comprobación del mutante PETA. (A) Representación esquemática de la región genómica *petRP* de la estirpe WT (silvestre) y PETA. (B) Análisis mediante PCR de la segregación de *slr0241* en PETA usando los oligonucleótidos 248-249.

2.2.2. Caracterización del intercambio citocromo c_6 /plastocianina en el mutante PETP.

Como en el apartado 2.1.3, para comprobar la relación de PetP con el intercambio Cit c_6 /Pc se analizaron cambios en la expresión de estos genes en la estirpe PETP respecto a la estirpe silvestre. Puesto que, presumiblemente, esta proteasa estaría implicada en la degradación de PetR también se analizaron los cambios en esta proteína (Figura 18). Como en el caso anterior *copM* se indujo en respuesta a cobre independientemente a la ausencia de la proteasa (Figura 18A). Sin embargo, el intercambio de *petJ* a *petE*, como en el caso del mutante PETR (Figura 15A), se vio alterado. En el mutante PETP este cambio no se produce ya que se mantuvo una expresión constitutiva y constante de *petJ* mientras que la expresión de *petE* nunca se activó (Figura 18A). Estos datos fueron apoyados con los niveles de proteína, mediante Western Blot, donde se analizó la cantidad de Cit c_6 , Pc, CopM y GSI (Figura 18B). Así en respuesta a cobre en la estirpe PETP se acumuló la forma procesada de CopM tanto en la estirpe mutante como en la estirpe silvestre pero no se produjo una acumulación de Pc, sino que se mantuvo una cantidad alta de Cit c_6 de forma casi constitutiva incluso 24 horas después de la adición de cobre.

Respecto a los cambios en la acumulación de PetR en respuesta a cobre se observó que en la estirpe PETP la cantidad de esta proteína se mantuvo constante incluso 24 horas tras la adición de cobre (Figura 18C). Todo esto indicaba que PetP degradaba a PetR y que el regulador está implicado en el intercambio *petJ*/*petE* de forma dependiente de cobre.

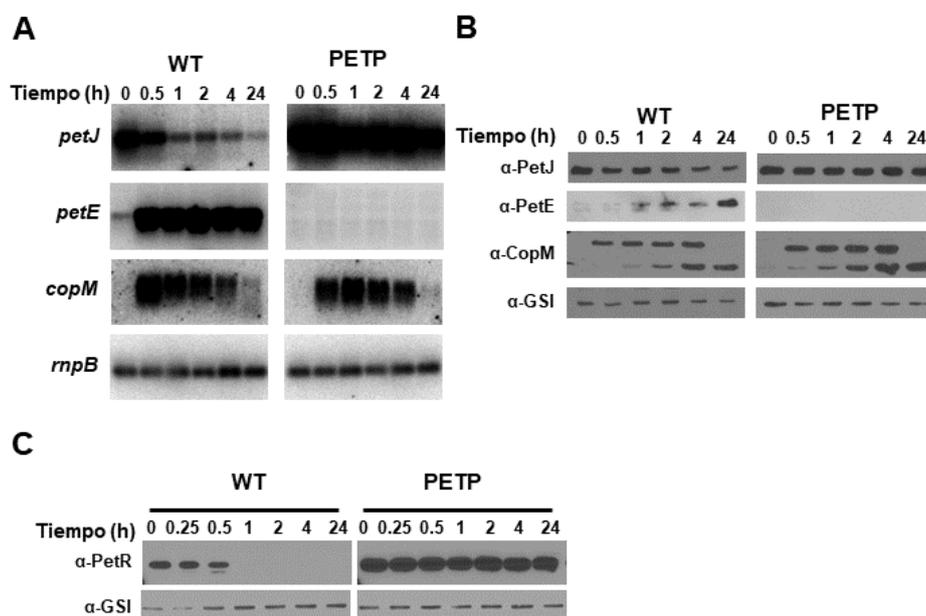


Figura 18. Análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y citocromo c_6 en respuesta a cobre en el mutante PETP. (A) Análisis mediante Northern Blot de *petE*, *petJ*, *copM* y *rnpB* en las estirpes WT (silvestre) y PETP cultivadas en BG11c-Cu en respuesta a la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Los filtros se hibridaron con las sondas para *petE*, *petJ* y *copM* y posteriormente, tras eliminar estas sondas, se rehibridó con la sonda de *rnpB*. **(B)** Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Se cargaron 5 μ g de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante

electroforesis SDS-PAGE. **(C)** Western Blot de PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Tras esto las células enteras fueron cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

2.3. Efectos de la mutación del operón *slr0240-41* en la regulación mediada por cobre.

Con el fin de comprobar que PetP actuaba aguas arriba de PetR se realizó este mismo estudio para una estirpe que careciera tanto de PetR como de PetP, la estirpe PETRP (Figura 19). Para generar este mutante se transformó la estirpe silvestre con el plásmido pPETRP_Sp (Figura 19A), de forma que ambos genes quedaban interrumpidos por el cassette de resistencia a Sp/St. La segregación de esta nueva estirpe se comprobó por PCR (Figura 14B).

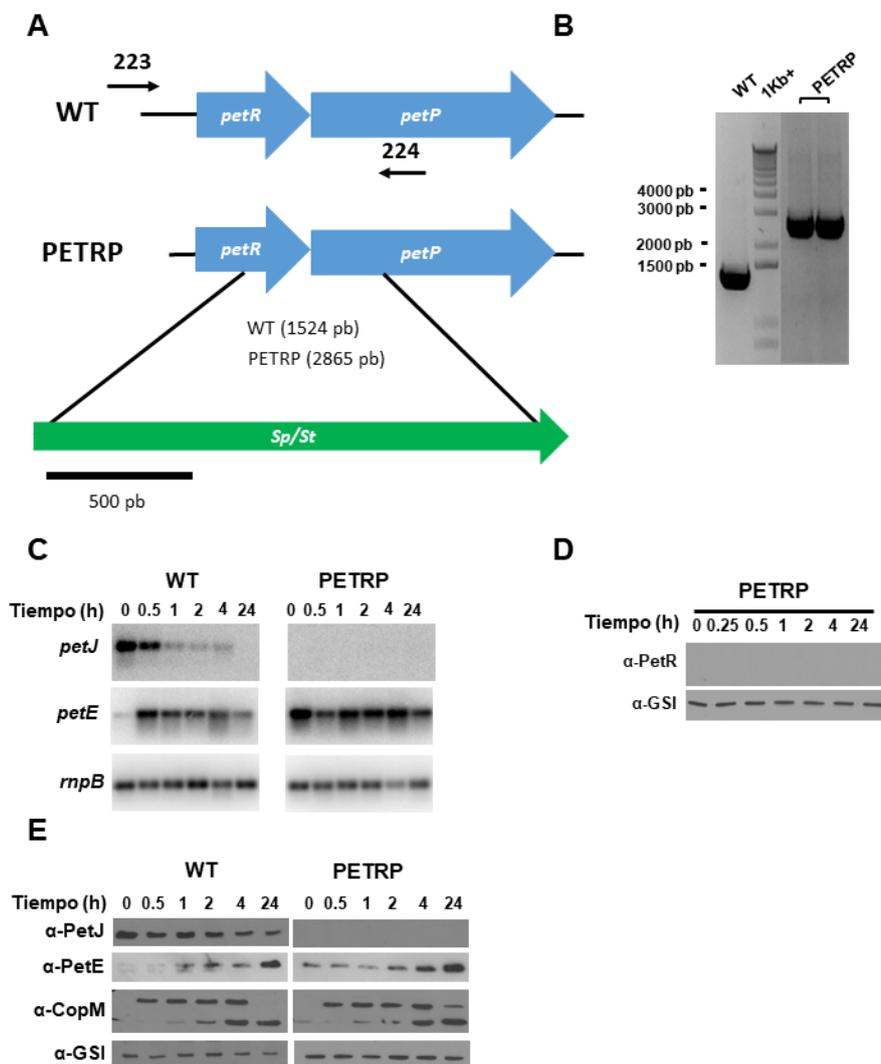


Figura 19. Construcción del mutante PETRP y análisis de la expresión y acumulación de la plastocianina y el citocromo c_6 en respuesta a cobre en él. (A) Representación esquemática de la región genómica *petRP* de la estirpe WT (silvestre) y PETRP. **(B)** Análisis mediante PCR de la segregación de *slr0240* en PETRP usando los oligonucleótidos 223-224. **(C)**

Análisis mediante Northern Blot de *petE*, *petJ* y *rnpB* en las estirpes WT (silvestre) y PETRP cultivadas en BG11c-Cu en respuesta a la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Los filtros se hibridaron con las sondas para *petE* y *petJ* y posteriormente se rehibridó con la sonda de *rnpB*. **(D)** Western Blot de PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETRP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Las células enteras fueron cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(E)** Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETRP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Se cargaron 5 µg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Para poder comparar las características de esta nueva estirpe con las estirpes PETR y PETP se realizaron los mismos que en las Figuras 15 y 18. Los resultados obtenidos para PETRP fueron idénticos a los observados en el mutante PETR, no se observó expresión de *petJ*, ni siquiera en un medio sin cobre, mientras que la expresión de *petE* fue constitutiva (Figura 19C). Como se esperaba no se detectó PetR en ninguna condición (Figura 19D). En cuanto a los niveles de proteína, mientras que Cit c₆ no se acumuló ni siquiera en ausencia de cobre en el medio, Pc se acumuló tanto en esta condición como tras la adición de cobre (Figura 19E). Esto coincidía con lo que ocurría en el mutante PETR, donde Pc se expresaba y acumulaba de forma constitutiva (Figura 15). Sin embargo, como también ocurría en dicho mutante, la acumulación de Pc parece ser mayor tras 24 horas de la exposición al metal. Que el mutante PETRP sea igual al mutante PETR señalaba que PetP actúa aguas arriba de PetR regulando, probablemente mediante proteólisis, su actividad.

2.4. Cuantificación de los niveles de Pc, Cit c₆ y PetR en relación a la disponibilidad de cobre.

Como una primera aproximación para conocer la variación en la cantidad de estos transportadores electrónicos en las estirpes PETR y PETP se cultivaron tanto estas como la estirpe silvestre en medios con diferente disponibilidad de cobre: BG11c (330 nM Cu), BG11c-Cu (~30 nM Cu) o BG11c-Cu+BCSA (sin cobre disponible) (Figura 20A). De forma que se analizó mediante Western Blot la cantidad de Cit c₆, Pc, PetR y GSI en cada una en las diferentes condiciones. De esta forma se ratificó que, independientemente de la disponibilidad de cobre, la acumulación de Cit c₆ era constante en el mutante PETP, aunque ligeramente menor a mayor disponibilidad de cobre. En el mutante PETR, aunque siempre estaba presente Pc independientemente de la presencia o ausencia de cobre, la proteína disminuía considerablemente cuanto menor fuera la cantidad de cobre en el medio. Esto establecía una relación directa entre estas dos proteínas y la regulación Pc/Cit c₆, de modo que PetR impediría la expresión de la plastocianina y PetP la del citocromo c₆. Además, PetR se acumuló en el mutante PETP independientemente de la disponibilidad de cobre (Figura 20A). Estos datos apoyan que la proteasa sería quien degradaría al regulador en un proceso dependiente de la presencia de cobre.

Para determinar si realmente la cantidad de proteína era constitutiva o presentaba variaciones dependiendo de la disponibilidad de cobre en el medio se calculó la cantidad de Cit c₆, Pc y PetR mediante Western Blot en las estirpes silvestre, PETR

y PETP en las diferentes condiciones de disponibilidad de cobre anteriormente descritas. Para esto se comparó la acumulación de estas proteínas respecto a la cantidad que presentaba la estirpe silvestre en condiciones ideales para la síntesis de Cit_{c6}, Pc o PetR. Para Cit_{c6} y PetR se tomó como máximo los cultivos de silvestre que habían crecido en BG11c-Cu+BCSA y en el caso de Pc los cultivos que crecieron en BG11c (Figura 20).

De esta forma se determinó que la cantidad de Pc en el mutante PETR, a pesar de que se diera en todas las condiciones de crecimiento, dependía de la disponibilidad de cobre, algo que no se observaba a nivel de transcrito (Figura 15A), donde la cantidad de *petE* no parecía cambiar en medio con Cu respecto a medio sin cobre. Por lo que la acumulación de esta proteína en el mutante PETR variaba en función de la disponibilidad de cobre en el medio (disminuyendo un 70% al pasar de un medio con cobre a un medio sin cobre) (Figura 20B y 20F), no obstante, no se alteró cuando esta estirpe había crecido en un medio con baja o con nula disponibilidad de cobre. La cantidad de Pc en la estirpe silvestre fue mucho menor que en la estirpe PETR incluso cuando ambas estirpes habían crecido con cobre en el medio, en este caso la cantidad de esta proteína en la estirpe silvestre era casi la mitad de la obtenida en PETR. Tanto en esta como en el resto de las condiciones de crecimiento la cantidad de proteína en la estirpe silvestre fue menor que en la estirpe PETR en dichas condiciones, disminuyendo hasta un 60% ante una baja disponibilidad de cobre y un 95% ante la ausencia de cobre en el medio (Figura 20B y 20F).

En el caso del citocromo los resultados son idénticos a los observados para la Pc, pero en el mutante PETP (Figura 20C, 20D, 20G). En dicha estirpe, aunque siempre se acumula el Cit_{c6}, independientemente de la disponibilidad de cobre del medio, la acumulación de la proteína era mayor en medio sin cobre con respecto a medio con cobre disponible. En este caso de que el medio presentase cobre, BG11c-Cu o BG11c, la cantidad de Cit_{c6} en PETP disminuyó a la mitad, aunque su acumulación no varió entre estas dos condiciones. En cualquier caso, la acumulación de Cit_{c6} en la estirpe PETP en medio sin cobre disponible fue un 50% superior a la de la estirpe silvestre en estas condiciones. La acumulación de citocromo en BG11c-Cu para ambas estirpes fue similar, pese a esto en condiciones donde la disponibilidad de cobre era alta (BG11c) la acumulación de esta proteína en la estirpe silvestre se encontraba por debajo de los límites de detección mientras que en la estirpe PETP era similar a la observada en condiciones con una baja disponibilidad de cobre (Figura 20F y 20G). En lo relativo a PetR la variación de esta proteína en la estirpe PETP dependiendo de la disponibilidad de cobre fue mínima (Figura 20C, 20D, 20H). Sin embargo, con una baja disponibilidad de cobre, medio BG11c-Cu, en la estirpe silvestre la disminución de PetR fue de un 90%, esto indicaba que el sistema de regulación de PetR (debido a PetP) debe tener una alta sensibilidad a cobre (Figura 20C, 20D, 20H). Estos resultados demostraron que, excepto en el caso de PetR, la expresión constitutiva de los genes no se tradujo en una acumulación constitutiva de Pc y Cit_{c6} en las estirpes PETR y PETP respectivamente, pese a que de forma independiente de la disponibilidad de cobre en estas estirpes se expresaron dichas proteínas (Figuras 15, 18 y 20).

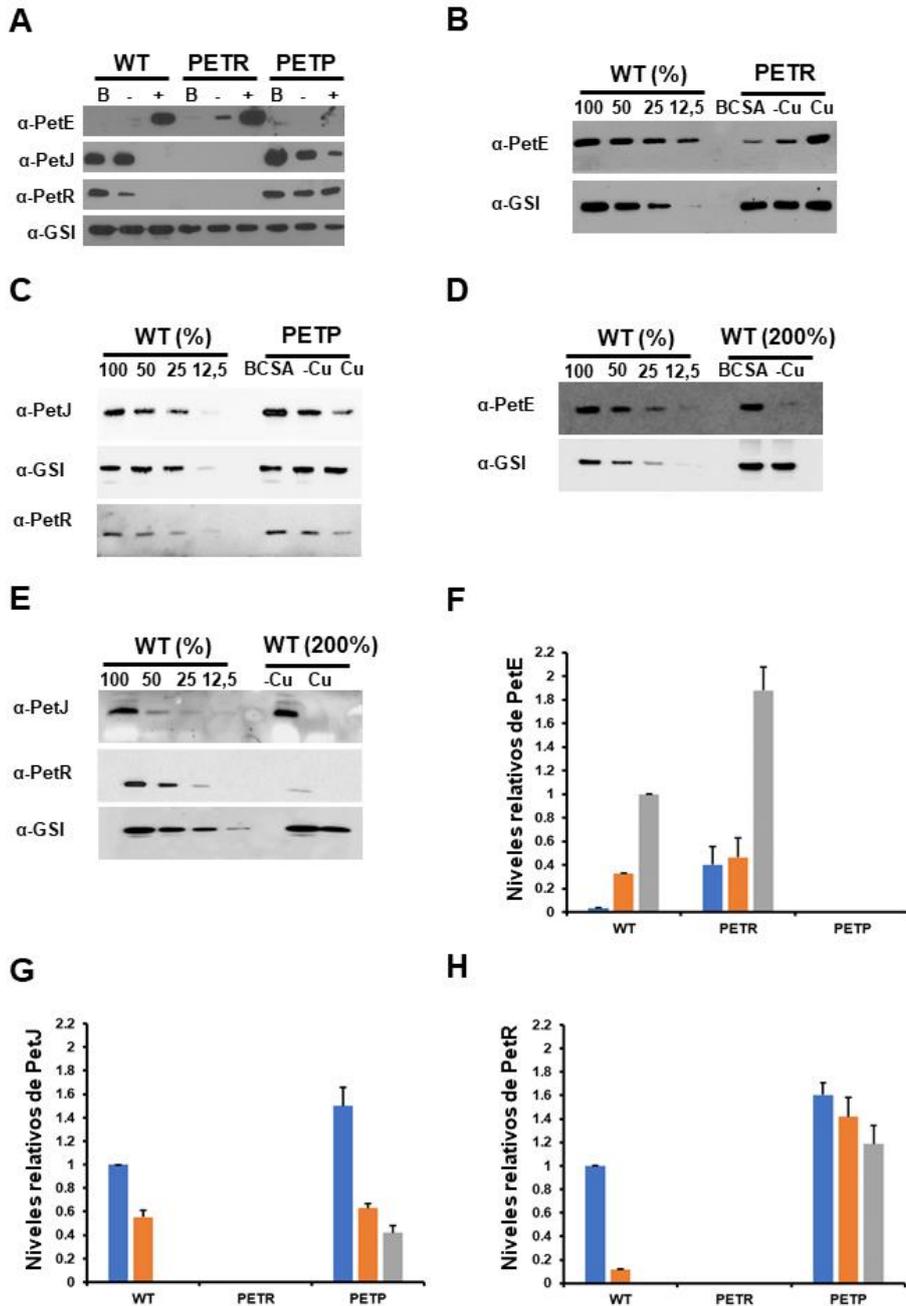


Figura 20. Cuantificación de PetJ, PetE y PetR en las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP en distintas disponibilidades de cobre. (A) Western Blot de PetJ, PetE, PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP cultivadas en BG11c-Cu+BCSA (B), BG11c-Cu (-) o BG11c (+). Se cargaron 10 µg de proteína de los extractos. (B) Western Blot de PetE y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETR donde la WT (silvestre) ha crecido en BG11c y PETR en BG11c, BG11c-Cu, BG11c-Cu+BCSA. Se cargaron cantidades decrecientes de proteína total de la estirpe WT (silvestre) (10, 5, 2,5 y 1,25 µg) y 10 µg del PETR en cada condición. (C) Western Blot de PetJ, PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETP. Se realizó el mismo proceso que el del apartado B pero la estirpe WT (silvestre) creció en medio BG11c-Cu+BCSA (D) Western Blot de PetE y GSI en la estirpe WT (silvestre) que ha crecido en BG11c, BG11c-Cu, BG11c-Cu+BCSA. Se cargaron cantidades decrecientes de proteína total de la estirpe WT (silvestre) en BG11c (10, 5, 2,5 y 1,25 µg) y 20 µg de las otras condiciones. (E) Western Blot de PetJ, PetR y GSI. Se realizó el mismo proceso que el del apartado D pero se cargaron cantidades decrecientes de la estirpe WT (silvestre) en BG11c-Cu+BCSA (F) Cuantificación de los niveles de PetE en las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP que se han cultivado en medio BG11c-Cu+BCSA, BG11c-Cu o BG11c. Se cargaron 10 µg de extracto soluble de WT (silvestre), PETR y

PETP en cada condición y estos fueron comparados con diluciones seriadas (100%, 50%, 25% and 12.5%) de extractos de WT (silvestre) que había crecido en BG11C. Las barras azules representan el medio BG11c-Cu+BCSA, las naranjas el medio BG11c-Cu y las grises el medio BG11c. El cálculo de la cantidad de proteína relativa se realizó empleando Image Lab Software y normalizando a la cantidad de GSI de las distintas muestras. **(G)** Cuantificación de los niveles de PetJ realizada de igual forma a la descrita en el apartado F. En este caso se compararon con la estirpe WT (silvestre) que había crecido en BG11c-Cu+BCSA. **(H)** Cuantificación de los niveles de PetR en las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP realizada de igual forma a la descrita en el apartado F. Los resultados son representativos o representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de las mismas. En todos los casos las estirpes han crecido burbujeadas con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Las proteínas fueron separadas en un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

2.5. Identificación de los genes regulados mediante el sistema *petRP*/PetRP.

Puesto que se ha demostrado que la mutación de cada uno de los genes del operón *petRP* genera cambios en la expresión de *petJ* y *petE* (Figuras 15B, 18B) se procedió a analizar si estos cambios eran extensibles para otros genes. Ya que PetR es un regulador transcripcional es posible que no solo actúe sobre estos dos genes, sino que podrían existir otros genes regulados por la proteína PetR en *Synechocystis*.

2.5.1. Efectos de la alteración de PetR y PetP en el transcriptoma.

Para caracterizar el sistema de regulación mediado por PetR/PetP se realizó un análisis transcriptómico utilizando RNA-seq de las estirpes silvestre, PETR, PETP. Este análisis permitía determinar los diferentes genes cuya expresión pudiese alterarse de forma dependiente de PetR. Así, las estirpes se cultivaron en medio BG11c-Cu hasta fase exponencial, tras lo cual se añadió 500 nM de Cu. Para el análisis de los transcritos se tomaron puntos previamente a la adición de Cu y tras dos horas de su adición en las tres estirpes. Por lo que se extrajo el RNA de las estirpes en ambas condiciones y se analizó el transcriptoma de estas por RNA-seq. Para determinar si existía una expresión diferencial de algún gen se compararon las lecturas para cada transcrito de cada mutante con las de la estirpe silvestre. Con el fin de determinar cuáles eran los genes con expresión diferencial para las comparaciones a realizar, se determinó un nivel de selección donde la diferencia de expresión debía ser de, al menos, un cambio de 2 veces y un FDR (False Discovery Rate) mayor que 0,01.

Para la estirpe silvestre se identificaron 11 genes inducidos (*petE*, *copMRS*, *copBAC* y *nrsBAC*) y 3 genes reprimidos (*petJ*, *slr0601*, *slr0602*) tras añadir cobre al medio, coincidiendo esto con los de estudios transcriptómicos anteriores (Giner-Lamia et al., 2014). Para esta misma comparación en el mutante PETR, se obtuvieron resultados similares para *copMRS*, *copBAC* y *nrsBAC* en cuanto a su inducción con cobre. Puesto que el mRNA de *petE* estaba ya presente previamente a la presencia de cobre sus niveles de expresión no variaron en dicha estirpe tras añadir el metal, a diferencia de lo que ocurría para la estirpe silvestre. En relación con los genes reprimidos en presencia de cobre, a diferencia de la estirpe silvestre, en el mutante PETR la expresión de *petJ*, *slr0601*, *slr0602* se mantuvo baja. Por lo que, ya que no

estaban inducidos en ausencia de cobre, la adición de cobre no reprimió su expresión. De tal forma que, si se comparaba la expresión en PETR en ausencia de cobre de *petJ*, *slr0601*, *slr0602* respecto a la estirpe silvestre en dichas condiciones, estos genes resultaron reprimidos en la estirpe PETR. De igual forma si se comparaba la expresión de *petE* en ausencia de cobre en ambas estirpes esta estaba inducida en PETR. Sin embargo, al analizar la estirpe PETP se determinó que la plastocianina no se expresaba en ninguna condición mientras que *petJ*, *slr0601* y *slr0602* no se reprimieron tras la adición de cobre (Figura 21). Por lo que al comparar la expresión de *petE* entre esta estirpe y la silvestre tras la adición de cobre el gen estaba reprimido en PETP. Mientras que, si se analizaba la expresión de *petJ*, *slr0601* y *slr0602* en presencia de cobre respecto a la silvestre los genes estaban inducidos en PETP. Estos datos indican que la regulación mediada por PetR-PetP solo se produciría sobre *petJ*, *petE* y *slr0601-slr0602* en *Synechocystis*. Además, los genes que se expresaban en un mutante estaban reprimidos en el otro.

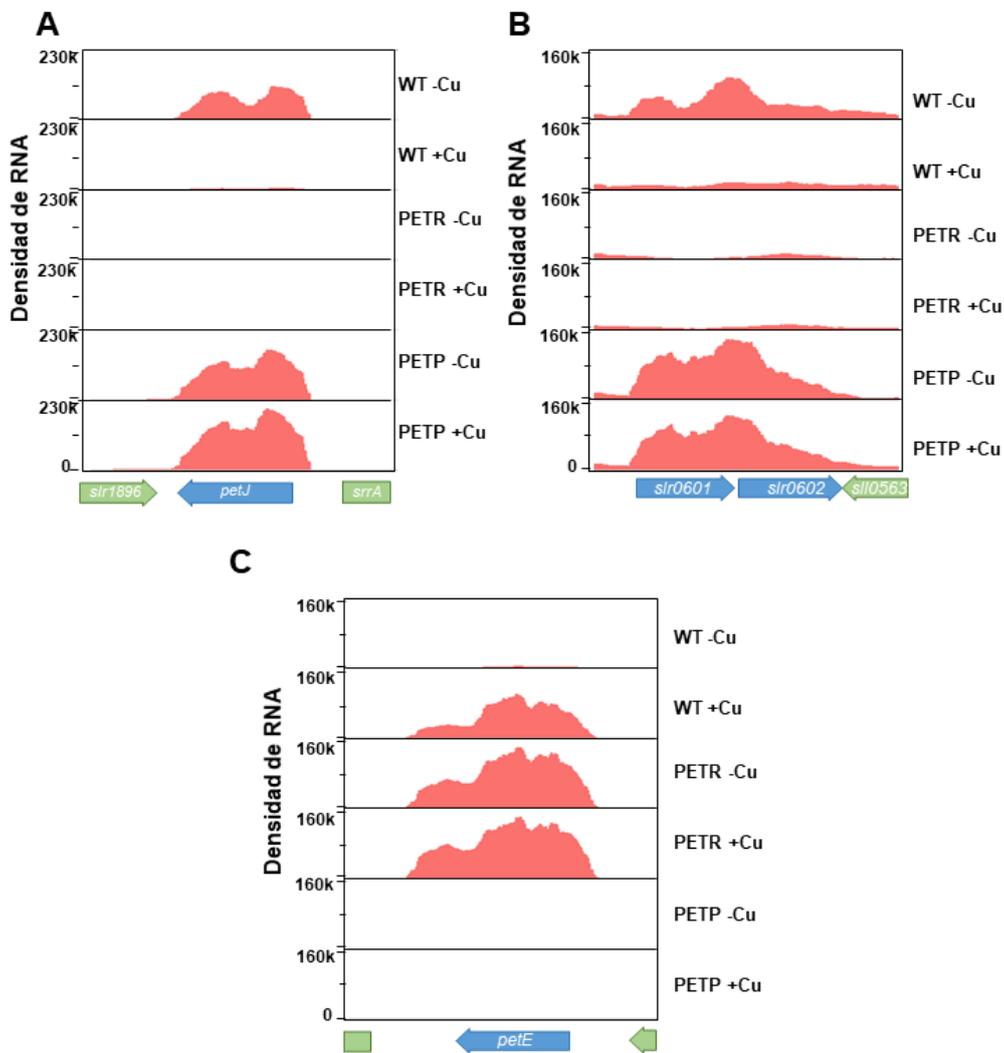


Figura 21. Análisis por RNA-seq de la regulación que depende de PetR-PetP. (A) Lecturas de *petJ* detectadas en el RNA-seq de las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP previa y posteriormente a la adición de 500 nM de Cu. **(B)** Lecturas de *slr0601-02* detectadas en el RNA-seq de las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP previa y posteriormente a la adición de 500 nM de Cu. **(C)** Lecturas de *petE* detectadas en el RNA-seq de las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP previa y posteriormente a la adición de 500 nM de Cu. Las flechas indican los sitios de

inicio de la transcripción (TSS) obtenidos de (Mitschke et al., 2011). Los resultados provienen de tres experimentos independientes.

2.5.2. Análisis de la capacidad reguladora de PetR sobre distintos promotores.

Debido a que PetR es un regulador transcripcional y está relacionado con la expresión de *petJ* y *petE* (Figuras 15B, 21) se quiso profundizar sobre cómo ejercería esta regulación sobre los genes que controla. De esta forma se esperaba determinar si la regulación era directa sobre los promotores mediante su interacción con ellos o necesitaba algún intermediario. Para estudiar este proceso se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) de las regiones promotoras de los genes regulados por PetR (Figura 21). Para ello se usaron las sondas de DNA pertenecientes al promotor de *petJ* o de *petE* y se incubó con una versión recombinante de PetR (Figura 22).

Al añadir PetR recombinante a la sonda de la región promotora de *petJ* (Figura 22A) la cantidad de sonda libre disminuyó conforme aumentaba la cantidad de proteína. Lo mismo ocurrió al añadir PetR a la sonda perteneciente a la región promotora de *petE* (Figura 22B), solo que en este caso la cantidad de regulador que era necesaria añadir para que toda la sonda quedara totalmente unida fue del orden de 10 veces menor. Puesto que para unirse a estas regiones promotoras no era necesaria la presencia de cobre se determinó que PetR era capaz de actuar directamente sobre los promotores de *petJ* y *petE* sin necesidad de este metal (Figura 22A, 22B). Aun así, para discernir si la presencia de Cu^+ o Cu^{2+} podría mejorar o alterar directamente la unión de PetR con estas regiones se realizó un ensayo donde una u otra forma del metal fueron añadidas junto a la sonda y PetR. La capacidad de unión de PetR a la región promotora de *petJ* (Figura 22C) o *petE* (Figura 22D) no se alteró por la presencia de la forma oxidada o reducida de cobre.

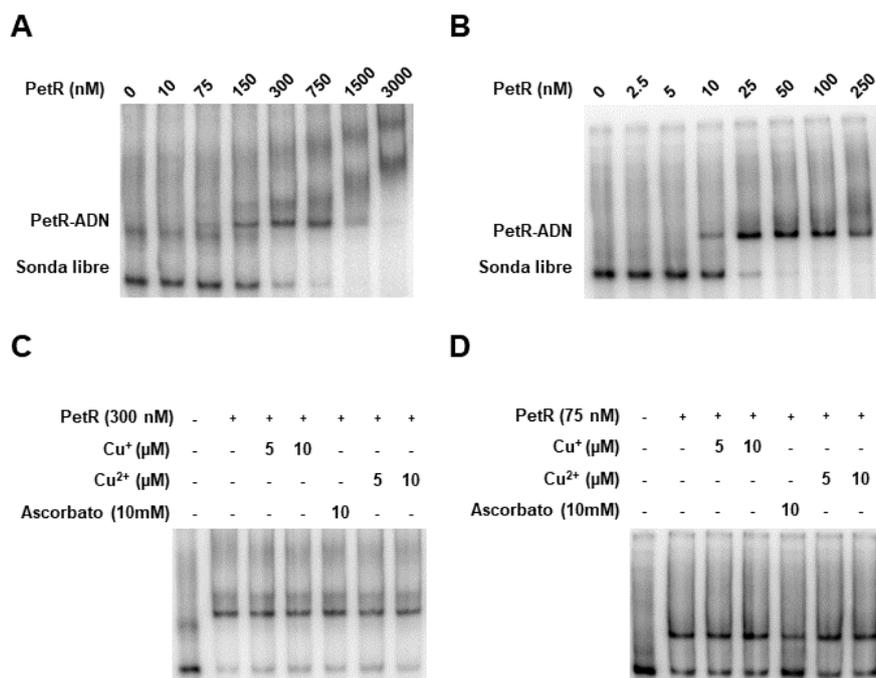


Figura 22. Análisis de la unión de PetR a los promotores de *petJ* y *petE*. (A) EMSA realizado con la sonda del promotor de *petJ* de 103 pb y la proteína recombinante PetR. La cantidad indicada de PetR fue añadida en cada ensayo. (B) EMSA realizado con la sonda del promotor de *petE* de 217 pb y la proteína recombinante PetR. La cantidad indicada de PetR fue añadida en cada ensayo. (C) EMSA realizado con la sonda del promotor de *petJ* de 103 pb y 300 nM de la proteína recombinante PetR en presencia de 5 o 10 μM de Cu^{2+} o Cu^+ (reducido con exceso de 1000 veces de ascorbato). Se añadió una muestra que solo contenía ascorbato como control. (D) EMSA realizado con la sonda de 217 pb del promotor de *petE* y 50 nM de la proteína recombinante PetR en presencia de 5 o 10 μM de Cu^{2+} o Cu^+ (reducido con exceso de 1000 veces de ascorbato). Se añadió una muestra que solo contenía ascorbato como control. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

Con el fin de identificar los sitios de unión de PetR con las secuencias promotoras de los genes *petE* y *petJ* se analizaron dichas zonas en distintas cianobacterias. Para ello se analizaron 300 pb de estas secuencias en ambos genes en los genomas de las cianobacterias que contaban con *petJ*, *petE* y *petRP*, empleando la base de datos MGcV. El resultado de dicho análisis, mediante el algoritmo MEMESuite, identificó un motivo que presentaba la secuencia GACN₅GTC totalmente conservada (Figura 23A). Esta secuencia conservada se encuentra a 75 pb del ATG (y 37 pb del sitio de inicio de la transcripción) en el promotor de *petJ* y a 118 pb (y 23 pb del sitio de inicio de la transcripción) en el caso de *petE* (Figura 23D). En cuanto a su posición en el promotor de *petJ*, esta posible secuencia de unión de PetR se encuentra en la caja -35 del promotor, algo que sugiere un posible papel de activador. Sin embargo, en el promotor de *petE* se encuentra entre las cajas -10 y -35 lo que es compatible con el papel represor de PetR en este gen. Estos resultados en base a las secuencias coincidieron con los obtenidos del análisis de los mutantes PETR y PETP que indicaban que PetR activa la expresión del citocromo mientras que reprime la de la plastocianina. Cuando solo se analizó el enriquecimiento usando los promotores de *petJ* se obtuvo un motivo que, aunque incluía el motivo central anterior, contiene también dos repeticiones directas en la forma TTTGAC-N₉-TTTGAC (Figura 23B). Al realizar este análisis, pero utilizando solo los promotores de *petE*, se identificó también una secuencia que presentaba unas

repeticiones inversas GACA-N₃-TGTC (que en *Synechocystis* es GACG-N₃-TGTC) y el motivo central general (Figura 23C). Estos datos sugieren que PetR, al igual que Blal y Mecl (Safo et al., 2005, 2006) debe unirse como un dímero a estos promotores. Sin embargo, el que las repeticiones sean directas o inversas dependiendo de su función sobre la expresión del gen en cuestión indica que podría presentar conformaciones diferentes dependiendo de que actúe como un activador o un represor. De forma que donde actúa como un represor (en *petE*) las repeticiones son invertidas tal como ocurría para los sitios de interacción con el DNA de Mecl y Blal, factores que actúan también como represores.

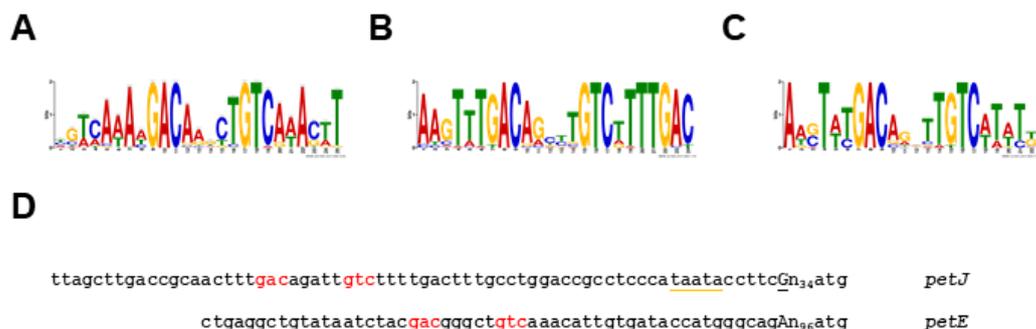


Figura 23. Análisis de los sitios de unión de PetR con los promotores de *petJ* y *petE*. (A) Secuencia consenso para la unión de PetR con los promotores identificada usando MEME y secuencias aguas arriba (300 pb) de los genes de *petE* y *petJ* de los genomas de cianobacterias que también presentan *petRP*. (B) Secuencia consenso para la unión de PetR con el promotor de *petJ* identificada usando MEME y secuencias aguas arriba (300 pb) del gen de *petJ* de los genomas de cianobacterias que también presentan *petRP*. (C) Secuencia consenso para la unión de PetR con el promotor de *petE* identificada usando MEME y secuencias aguas arriba (300 pb) del gen de *petE* de los genomas de cianobacterias que también presentan *petRP*. (D) Alineamiento de las secuencias de los promotores de *petJ* y *petE* en *Synechocystis*. Los sitios de inicio de la transcripción están en mayúscula y subrayado, la caja -10 está subrayado en amarillo y los nucleótidos conservados del motivo de A están reseñados en rojo.

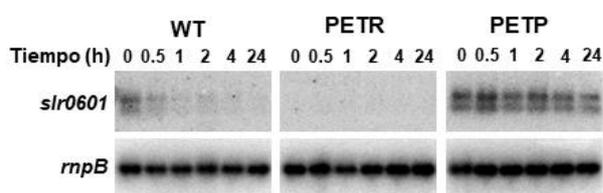
3. Estudio del gen *slr0601* regulado por PetR.

Puesto que el operón *slr0601-02* parece formar parte del regulón de PetR, se estudió el patrón de expresión del gen *slr0601* en los mutantes PETR y PETP (Figura 24A). Para esto se analizaron las muestras de las estirpes silvestre, PETR y PETP empleadas para los estudios anteriores donde se determinaba el efecto de la adición de 500 nM de cobre en la expresión de los genes *petE* y *petJ* (Figuras 15,18). En cuanto a la expresión de *slr0601* se observó el mismo efecto que se había observado respecto a *petJ*. Por lo que *slr0601* en la estirpe silvestre presentaba una expresión dependiente de cobre que disminuía cuando este estaba presente. Por tanto, la expresión de este gen en la estirpe PETP donde la expresión de PetR es constitutiva, fue constitutiva también (independientemente del metal). Por el contrario, en la estirpe PETR no se detectó la expresión del mismo (Figura 24A) ni en ausencia de cobre. Por lo que este gen estaba regulado positivamente por PetR, como ocurre con *petJ*. Estos resultados coincidieron con los datos obtenidos por RNA-seq (Figura 21B). Para determinar si, como en el caso de los dos genes *petJ* y *petE*, la regulación mediada por PetR se ejercía directamente sobre la región promotora de *slr0601*, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética. Usando una sonda de la región promotora de *slr0601* a la que se le

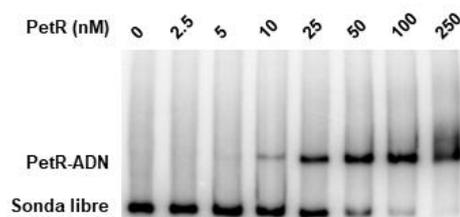
adicionó la proteína PetR recombinante (Figura 24B) se determinó que el regulador era capaz de unirse a esta región del gen *slr0601*. A diferencia de la unión de PetR con la región promotora de *petJ*, donde ejercía un efecto activador, se necesitaba de una cantidad menor de regulador para que toda la sonda se retrasase en el gel (Figuras 22, 24B). La cantidad necesaria es similar a la requerida para la región promotora de *petE* (Figura 22B). Además, empleando los métodos bioinformáticos anteriormente descritos, se determinó el sitio de unión de PetR con *slr0601*, donde este promotor presentaba la misma secuencia conservada (GACN₅GTC) que presentaban los dos promotores anteriores (Figuras 23). Igualmente, el promotor presentaba las repeticiones directas identificadas solamente en el promotor de *petJ*.

Por tanto, el sistema regulador PetPR es capaz de regular también la expresión de este gen. De forma que PetR es capaz de activar la expresión de *slr0601* y esta regulación positiva se dificulta cuando hay cobre en el medio, ya que probablemente se produce la proteólisis de PetR por parte de PetP.

A



B



C

```

cccgcaaatggattcattagataaattattggcacataaaattagtggaactttcgccct
agcccgccgggaaaccaagtttgacgggctgtctttgacccttgaacgttattctgcc
taggataggggscattcttttagcagaaatttactaaatttccccATG

```

Figura 24. Análisis de la unión de PetR al promotor de *slr0601*. **(A)** Northern Blot del gen *slr0601* en las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP. El RNA total se aisló de células que se cultivaron en medio BG11c-Cu al que se le añadió 500 nM de Cu. Las células se recogieron a los tiempos indicados. Los filtros se hibridaron con la sonda *slr0601* y posteriormente se rehibridaron con la sonda de *mpB* como control. **(B)** EMSA realizado con la sonda del promotor de *slr0601* de 177 pb y la proteína recombinante PetR. A cada carril se le añadieron las concentraciones de PetR indicadas. **(C)** Secuencia del promotor de *slr0601*. Los sitios de inicio de la transcripción están marcados con una letra mayúscula y subrayados, los nucleótidos conservados del motivo de la figura 23A están representados en morado y las repeticiones directas en rojo. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

3.1. Estudio fisiológico del mutante SLR0601.

La proteína codificada por el gen *slr0601* corresponde a una molécula de 13,45 KDa y función desconocida. Para estudiar si presenta una relación con la respuesta a cobre se generó una estirpe carente de esta proteína mediante una construcción donde el gen estaba interrumpido por un gen de resistencia a nouseltricina (Nat). Para esto se transformó la estirpe silvestre con el plásmido pSpark_slr0601::nat, generándose la estirpe SLR0601 (Figura 25A). La total segregación de este mutante se determinó por PCR de colonias mediante la amplificación del gen *slr0601* (Figura 25B).

El crecimiento de este mutante ante diferentes condiciones de disponibilidad de cobre (BG11c, BG11c-Cu y BG11c-Cu+BCSA) se analizó mediante su comparación con la estirpe silvestre (Figura 25C) para intentar dilucidar una función de esta proteína relacionada con la respuesta a cobre. Sin embargo, no se encontraron diferencias de crecimiento en ninguna condición. Por tanto, no se pudo establecer una relación entre esta proteína desconocida y la respuesta a cobre.

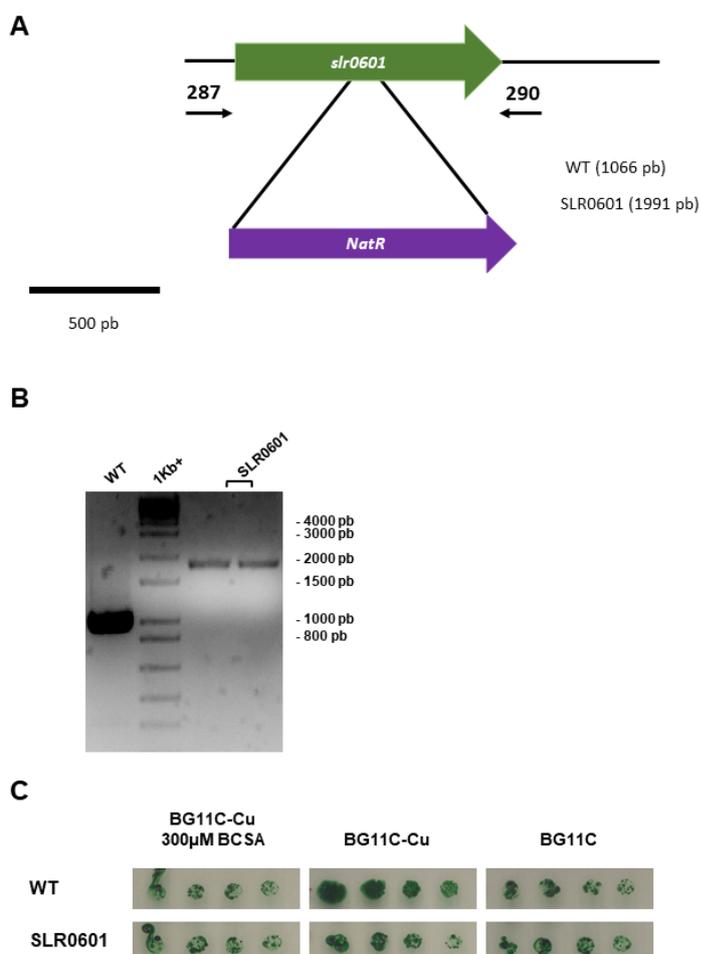


Figura 25. Construcción, comprobación y fenotipo de la estirpe SLR0601. (A) Representación esquemática de la región génica *slr0601* en la estirpe mutante SLR0601. **(B)** Análisis mediante PCR de la segregación de *slr0601* en SLR0601 usando los oligonucleótidos 287-290. **(C)** Crecimiento de la estirpe WT (silvestre) y SLR0601 en medio sólido con diferentes disponibilidades de cobre a $50 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; los cultivos en fase exponencial se igualaron

a DO_{750 nm} de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose 5 µl de cada una. Los resultados son representativos de, al menos, tres repeticiones independientes.

4. Caracterización de la actividad proteasa de PetP sobre PetR.

En los distintos estudios realizados en apartados anteriores se ha señalado a PetP como la proteasa que probablemente sea capaz de actuar sobre PetR *in vivo* y degradarlo. Sería la encargada de, ante un cambio en la disponibilidad de cobre en el medio, disparar un sistema de regulación que daría como resultado al cambio en la expresión de los genes *petJ*, *petE* y *slr0601-02*. Por tanto, esta proteasa debería poder degradar al regulador ante esta señal como lo hacen las proteínas MecR1 y BlaR1 de su misma familia sobre sus reguladores (Llarrull et al., 2011; Peacock y Paterson, 2015). Para comprobar su capacidad proteasa sobre PetR se realizaron una serie de experimentos *in vitro*.

4.1. Determinación *in vitro* de la actividad proteasa de PetP.

Para estudiar la actividad proteasa de PetP *in vitro* se han empleado extractos totales de las estirpes silvestre, PETR y PETP de *Synechocystis*. Se realizó el ensayo descrito en el apartado 5.3. de Materiales y Métodos utilizando PetR-GST como sustrato y analizando los niveles de esta proteína mediante Western Blot a las 0, 1, 3 y 5 horas de la adición, o no, de 500 nM de Cu al extracto obtenido de un cultivo que había crecido en un medio sin cobre (Figura 26A). Con este ensayo se comprobó que, si el medio no contaba con cobre o contenía solamente las trazas mínimas del metal, no se observaba degradación del regulador exógeno añadido a las membranas de ninguna estirpe. Sin embargo, cuando se añadió cobre a las membranas en aquellas muestras que contenían PetP (silvestre, PETR) se observó una disminución de la cantidad de PetR-GST. Esta disminución de la cantidad de PetR-GST detectada, que debe deberse a la degradación del regulador, indicaba que la proteasa era capaz de, ante una señal por cobre, activarse y degradar a PetR. El hecho de que en las membranas del mutante PETP en presencia de cobre no se produjera un cambio en los niveles de PetR-GST, a diferencia de las membranas de las estirpes silvestre y PETR, era indicativo de que PetP era necesaria para degradar PetR (Figura 26A).

Para comprobar que la acción de PetP sobre PetR era directa y no necesitaba de ninguna otra proteína de *Synechocystis* se realizó este mismo ensayo para estirpes de *E. coli* que habían sido previamente transformadas con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT o pPlat_phaAB_PcpcB_NatR. Las células obtenidas de la transformación con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT (*PpetRP*) contenían tanto la proteasa como el regulador de *Synechocystis*, mientras que las transformadas con el segundo plásmido (*Pvacío*) fueron utilizadas de control ya que contenían el resto del plásmido sin ambos genes. Los extractos totales de *PpetRP* fueron capaces de degradar PetR-GST cuando se les añadió cobre mientras que en ausencia de cobre este efecto no se observó y en el caso de las muestras procedentes de las membranas de *Pvacío* no ocurrió degradación del regulador ni en presencia ni en ausencia de cobre (Figura 26B). De esta forma se determinó que la acción de PetP era directa sobre PetR y no necesitaba de ninguna proteína adicional. Por tanto, PetP actúa sobre PetR en una respuesta dependiente de cobre

degradando a PetR, y en este mecanismo proteolítico y de transducción de la señal solo están implicados PetR y PetP.

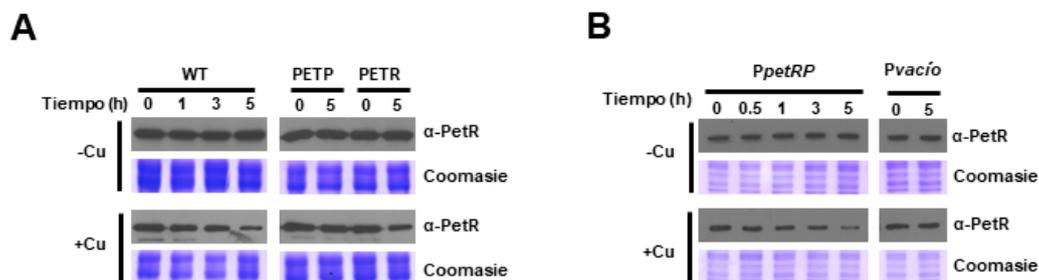


Figura 26. Determinación de la actividad proteasa de PetP sobre PetR de forma dependiente de cobre. (A) Las estirpes WT (silvestre), PETP y PETER crecieron en medio BG11c-Cu burbujado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Posteriormente se obtuvieron los extractos de las mismas y se incubaron con la proteína PetR-GST durante los tiempos indicados tras la adición o no de 500 nM de CuSO₄. **(B)** Las estirpes *PpetRP* y *Pvacío* crecieron en medio mínimo M9 (Neidhardt et al., 1974) suplementado con LB 0,1%. Se obtuvieron los extractos de las mismas y se incubaron con la proteína PetR-GST durante los tiempos indicados tras la adición o no de 500 nM de CuSO₄. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. En ambos casos las proteínas se separaron con un gel al 12% mediante SDS-PAGE. PetR-GST se detectó mediante Western Blot. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

4.2. Determinación de residuos implicados en la actividad proteasa.

Los resultados obtenidos indicaban que PetP sería capaz de detectar cobre y, como resultado degradar a PetR. Con el objetivo de determinar qué residuos de PetP podrían estar implicados en este proceso se procedió a generar mutantes puntuales tanto de las histidinas conservadas del motivo HEXXH como las metioninas conservadas que podrían estar implicadas en detectar del cobre.

4.2.1. Generación de mutantes PETP con residuos alterados.

Para la generación de los diferentes mutantes puntuales de PetP se transformó el mutante PETERP con varias construcciones, siendo una de estas la complementación de la mutación PETERP. De forma que, para generar la estirpe PETERP+RP este se transformó con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT (Figura 27A). Para generar la estirpe PETERP+HAHA, donde las histidinas 150 y 154 de PetP fueron sustituidas por alaninas, el mutante PETERP se transformó con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_HAHA. En cuanto a la generación de los mutantes PETERP+M53A, PETERP+M58A y PETERP+M53AM58A, donde las metioninas 53, 58 o ambas de PetP se alteraron por alaninas, la estirpe PETERP se transformó con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_M53A, pPHAB_Nat_petRP_M58A o pPHAB_Nat_petRP_M53A_M58A. En todos los casos los genes que codifican para *petR* y *petP* se introdujeron bajo su propio promotor (Figura 27A). La segregación de estas estirpes se comprobó mediante PCR (Figura 27B).

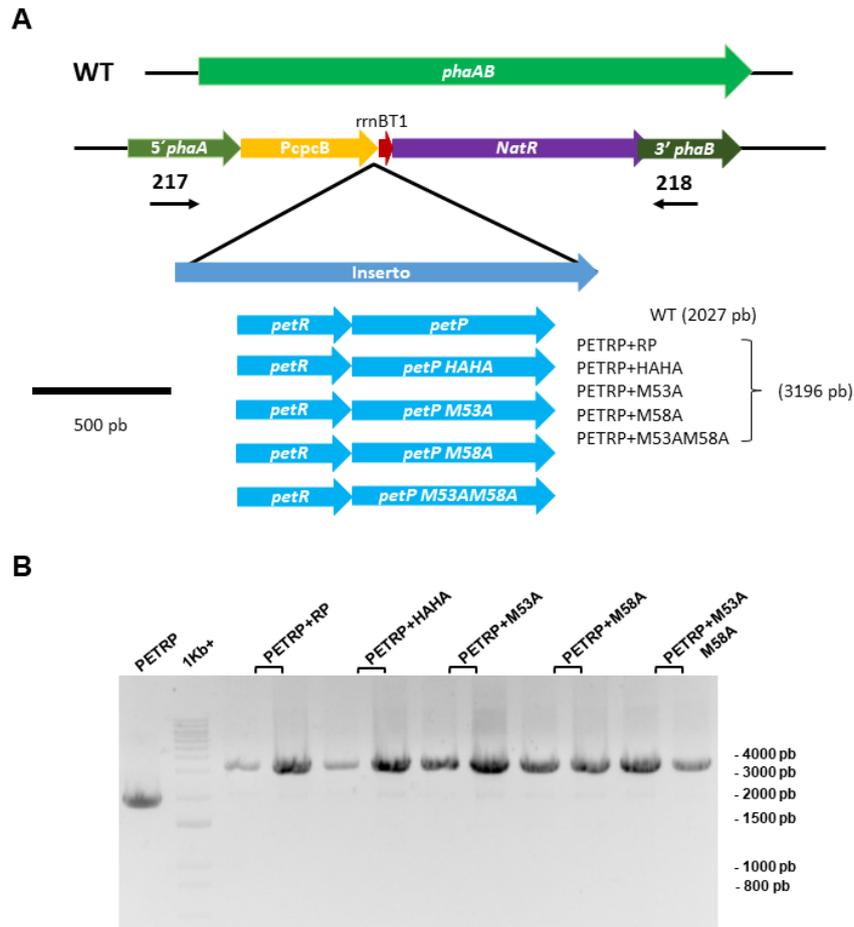


Figura 27. Construcción de las estirpes PETRP+RP, PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A. (A) Representación esquemática de la región genómica *phaAB* de la estirpe WT (silvestre) y de los mutantes PETRP+RP, PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A donde los genes *slr0240-41* (*slr0241* puede tener residuos alterados dependiendo del mutante) se expresaron bajo su mismo promotor en otra región del genoma de *Synechocystis*. **(B)** Análisis mediante PCR de la región entre *phaA* y *phaB* para comprobar la segregación de las inserciones de *slr0240-41* en los mutantes PETRP+RP, PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A empleando los oligonucleótidos 217 y 218. Como control se empleó la estirpe PETRP, parental de los mutantes.

4.2.2. Análisis fenotípico del mutante PETRP complementado.

Ya que todas las estirpes generadas de mutantes de PetP se basaron en la complementación del mutante PETRP bajo su propio promotor se procedió a comprobar que la estirpe PETRP+RP recuperaba el fenotipo silvestre (Figura 28). Para ello se realizó un experimento donde a las estirpes silvestre y PETRP+RP al llegar a fase exponencial, creciendo en un medio BG11c-Cu, se les añadió 500 nM de cobre. A continuación, se analizó la acumulación de las proteínas Cit₆, Pc, CopM y GSI mediante Western Blot. Como se muestra en la Figura 28A la estirpe PETRP+RP presentaba un fenotipo silvestre a diferencia de su parental PETRP (Figura 19). Además, en esta estirpe se observó la presencia de PetR en medio sin cobre y su degradación dependiente del mismo (Figura 28B). Por otra parte, para comprobar la actividad proteasa de la estirpe PETRP+RP se realizó el mismo experimento analizado en el apartado 4.1 con el extracto total de las estirpes

silvestre, PETRP y PETRP+RP (Figura 28C). Con este experimento se determinó que la estirpe PETRP+RP, a diferencia de las de la estirpe PETRP, es capaz de degradar la proteína PetR+GST añadida. Por tanto, la transformación de la estirpe PETRP con el plásmido pPHAB_Nat_petRP_WT recupera el fenotipo silvestre completamente.

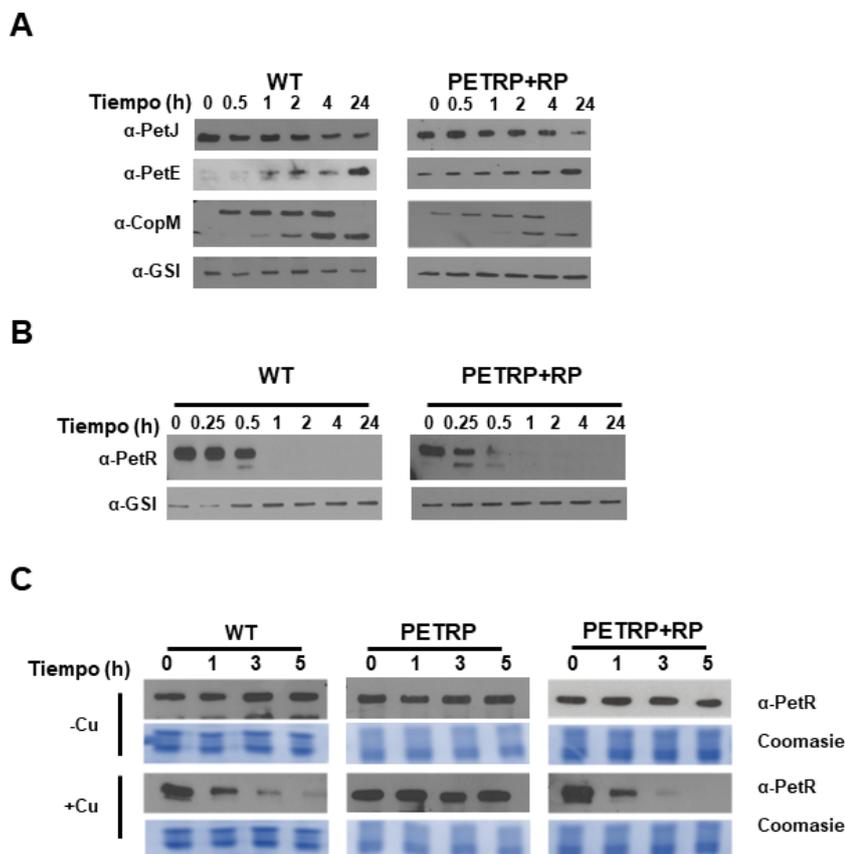


Figura 28. Comprobación de la recuperación del fenotipo WT en la estirpe PETRP+RP. (A) Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETRP+RP, cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. La proteína total se aisló en los tiempos indicados. Se cargaron 5 µg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(B)** Western Blot de PetR y GSI en las estirpes WT (silvestre) y PETRP+RP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. Tras esto las células fueron recogidas a los tiempos indicados y las células enteras fueron cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(C)** Las estirpes WT (silvestre) y PETRP+RP crecieron en medio BG11c-Cu burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Posteriormente se obtuvieron los extractos de las mismas y se incubaron con la proteína PetR-GST durante los tiempos indicados tras la adición o no de 500 nM de CuSO₄. Las proteínas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. PetR-GST se detectó mediante Western Blot. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

4.2.3. Análisis fenotípico de los mutantes puntuales de PetP.

Puesto que la estirpe PETRP+RP era fenotípicamente igual a la estirpe silvestre (Figura 28) y que se siguió el mismo diseño experimental que para obtener las estirpes PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A (Figura 27) se empleó PETRP+RP como control en los experimentos relativos a las

mutaciones puntuales de PetP. Por tanto, la similitud del comportamiento de estas estirpes con la silvestre se dedujo con respecto a la similitud con PETRP+RP. Como una primera aproximación se analizó si se producían cambios en el crecimiento de estas estirpes mutantes con respecto a las estirpes silvestre, PETRP, y PETRP+RP en medios con diferente disponibilidad de cobre (Figura 29). Se determinó que, a diferencia de la estirpe PETRP que crecía más lentamente en medio sin cobre disponible, todas las estirpes generadas parecen crecer a la misma velocidad que la estirpe silvestre independientemente de la disponibilidad de cobre.

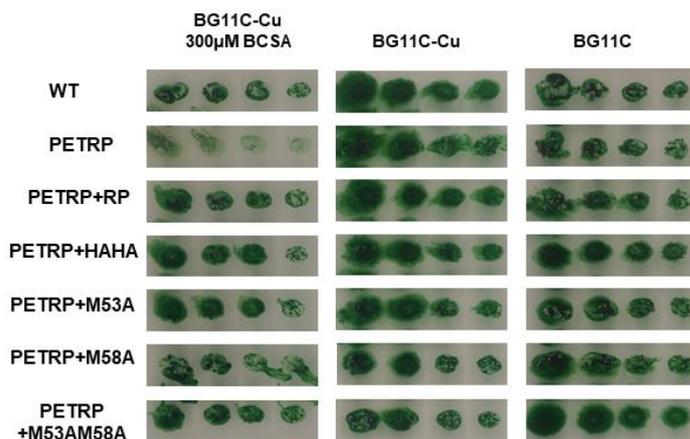


Figura 29. Comparación del crecimiento de las estirpes WT, PETRP, PETRP+RP, PETRP+HAHA, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A ante diferente disponibilidad de cobre. Crecimiento de las estirpes en medio sólido con diferente disponibilidad de cobre a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; los cultivos en fase exponencial de cada una de las estirpes se igualaron a $\text{DO}_{750 \text{ nm}}$ de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose 5 μl de cada una. Los resultados son representativos de, al menos, tres repeticiones independientes.

4.2.3.1. Análisis fenotípico del mutante PETRP+HAHA.

La primera estirpe analizada fue PETRP+HAHA, aquella en la que se habían eliminado las histidinas del motivo conservado HEXXH. Estas histidinas en otras proteasas de la misma familia dependientes de zinc están implicadas en la coordinación con el átomo de Zn^{2+} (Rawlings y Barrett, 1995; Zhang et al., 2001). En dichas proteasas la pérdida de la capacidad de coordinar con este metal conlleva una pérdida de la actividad proteasa. Para determinar el fenotipo de esta estirpe se realizaron los mismos experimentos de la sección 4.2.2., solo que en esta ocasión la estirpe control fue PETRP+RP (Figura 30). De forma que primero se estudió la acumulación de las proteínas Cit c_6 , Pc, CopM y GSI (Figura 20A) en respuesta a cobre. Este mutante presentó grandes semejanzas con la estirpe PETP ya que acumulaba constitutivamente Cit c_6 , independientemente de la disponibilidad de cobre, y no acumulaba Pc aún tras 24 horas en presencia de cobre (Figura 30A). Para analizar si esta proteína alterada conservaba cierta actividad proteasa se comprobó la acumulación de PetR en respuesta a cobre respecto a la estirpe PETRP+RP mediante Western Blot (Figura 30B). La estirpe PETRP+HAHA acumulaba PetR de forma constitutiva e independiente de la presencia o ausencia de cobre, como ocurría en la estirpe PETP. Por último, se quiso determinar si los extractos (incluyendo las membranas donde estaría PetP) de esta estirpe

presentaban actividad proteasa (Figura 30C). Por lo que el extracto total de las estirpes PETRP+RP y PETRP+HAHA se incubó en presencia o no de cobre con PetR-GST y se determinó que tanto en presencia como en ausencia de cobre las membranas de la estirpe PETRP+HAHA, a diferencia de la estirpe PETRP+RP, eran incapaces de degradar PetR-GST, tal como ocurría en la estirpe PETP (Figura 26).

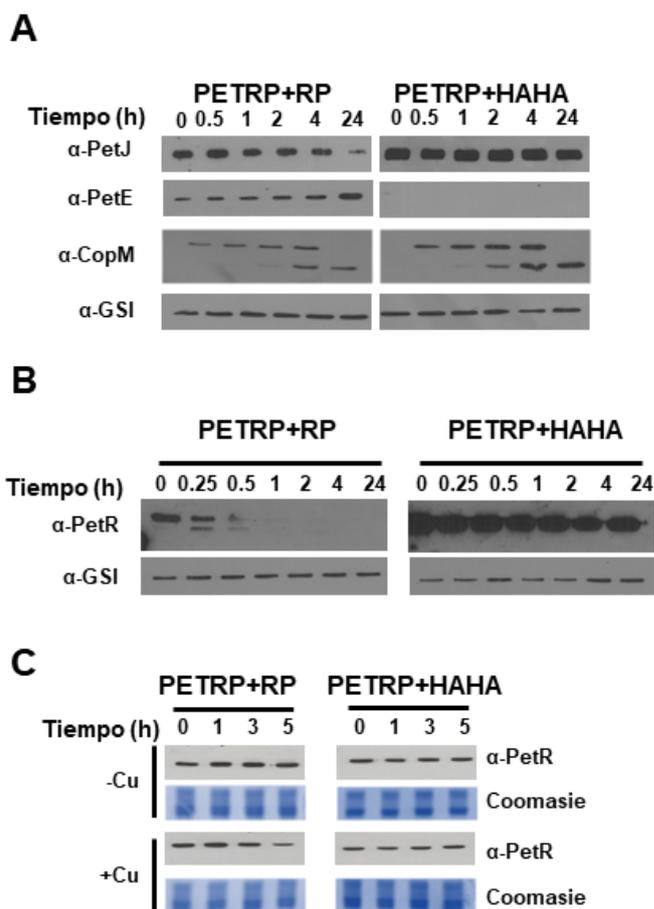


Figura 30. Determinación del efecto de la sustitución de las histidinas H150 y H154 en PetP en el intercambio PetJ/petE y su actividad proteasa sobre PetR. (A) Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en las estirpes PETRP+HAHA y PETRP+RP que han sido cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. Se cargaron 5 µg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(B)** Western Blot de las proteínas PetR y GSI en las estirpes PETRP+HAHA y PETRP+RP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. Las células fueron recogidas a los tiempos indicados, cargadas (0,2 DO_{750nm}) y separadas con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(C)** Las estirpes WT (silvestre) y PETRP+HAHA crecieron en medio BG11c-Cu burbujado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Posteriormente se obtuvieron los extractos de las mismas y se incubaron con la proteína PetR-GST durante los tiempos indicados tras la adición o no de 500 nM de CuSO₄. Las proteínas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. PetR-GST se detectó mediante Western Blot. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. En todos los casos los cultivos fueron burbujado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

El conjunto de los resultados obtenidos con el mutante PETRP+HAHA indican que la eliminación de las histidinas conservadas inactiva la actividad proteasa de PetP, probablemente por impedir su unión con el átomo de Zn. Como ocurre en las proteasas de la familia M48/M56.

4.2.3.2. Análisis fenotípico de los mutantes puntuales de las metioninas M53 y M58.

Ya que las metioninas pueden ser residuos implicados en la coordinación con cobre (Lu, 2003; Le Sueur et al., 2016) y las metioninas M53 y M58 de PetP están totalmente conservadas en las cianobacterias (Figura 16A) se generaron los mutantes de la proteasa M53A, M58A y M53AM58A. De forma que la introducción de estas proteínas alteradas permitiera determinar si estos residuos estaban o no implicadas en el proceso de percepción de cobre de la proteasa. La primera aproximación para determinar si existía una relación real entre estas metioninas y la capacidad de detectar cobre de la proteasa se realizó mediante la transformación de células de *E. coli* con los plásmidos pPHAB_Nat_petRP_WT, pPHAB_Nat_petRP_M53A, pPHAB_Nat_petRP_M58A y pPHAB_Nat_petRP_M53AM58A, por lo que estas bacterias expresarían en sus membranas la proteasa de *Synechocystis* con o sin las metioninas alteradas. Con estas células se realizó el mismo experimento que en la sección 4.1., por lo que los extractos de las diferentes estirpes generadas se incubaron en presencia o ausencia de cobre con PetR-GST. En este caso, a diferencia de en la sección 4.1., se añadieron concentraciones crecientes de cobre con el objetivo de determinar si presentaba una sensibilidad a cobre diferente a la de la estirpe control. De los extractos incubados con cada una de estas concentraciones se tomó un punto tras 5 horas de la adición de cobre y también se tomó un punto antes y tras 5 horas de incubación sin haber añadido cobre, usando este último como control de que realmente el medio no contenía un elemento que promoviera la actividad proteasa. En ninguno de los casos PetP ejercía su actividad proteasa sobre PetR-GST si no había cobre presente (Figura 31B). Se comprobó que el doble mutante de ambas metioninas era incapaz de detectar el cobre independientemente de la concentración del mismo mientras que en una proteasa silvestre el cobre se detecta por encima de 50 nM eficientemente (Figura 31A). En el caso de los mutantes simples de M53A y M58A se observó una ligera capacidad proteasa con la consiguiente disminución de PetR-GST, pero en ningún caso comparable con la de PetP silvestre (Figura 31A).

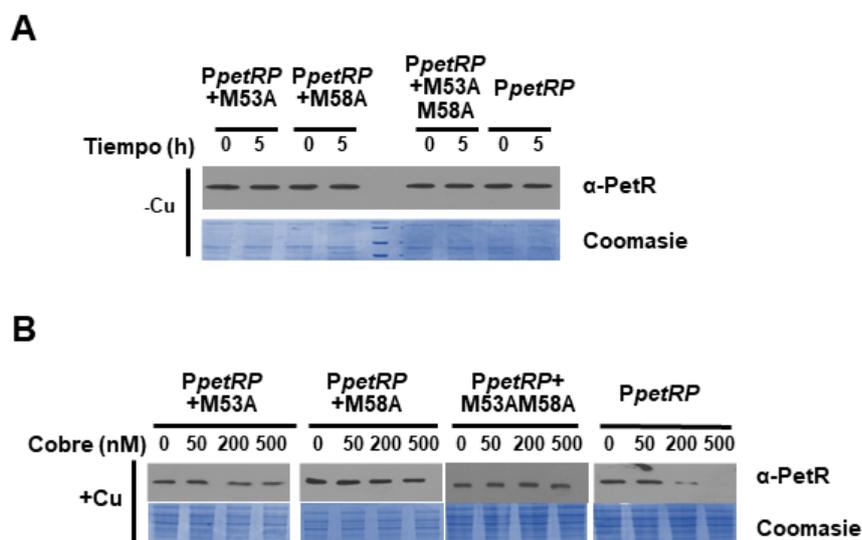


Figura 31. Determinación del efecto de la sustitución de las metioninas M53 y/o M58 en la percepción de cobre de PetP. (A) La proteína PetR-GST se incubó durante 5 horas con extracto total de *E. coli* que habían sido transformadas con los plásmidos pPHAB_Nat_petRP_M53A, pPHAB_Nat_petRP_M58A, pPHAB_Nat_petRP_M53AM58A o pPHAB_Nat_petRP_WT. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. **(B)** La proteína PetR-GST se incubó durante 5 horas a las concentraciones de cobre indicadas con extracto total de *E. coli* que habían sido transformadas con los plásmidos pPHAB_Nat_petRP_M53A, pPHAB_Nat_petRP_M58A, pPHAB_Nat_petRP_M53AM58A o pPHAB_Nat_petRP_WT. En ambos casos las células habían crecido en medio mínimo M9 suplementado con LB 0,1% y las proteínas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. PetR-GST se detectó mediante Western Blot. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Los resultados obtenidos sugerían que ambas metioninas estarían implicadas en la detección de cobre y cuando se carece de una de ellas la actividad proteasa se vería mermada, mientras que en el doble mutante la proteína es insensible al cobre añadido (Figura 31). Para determinar si estas mutaciones afectan *in vivo* en *Synechocystis* a la actividad proteasa se analizó la acumulación de Cit_{c6}, Pc, CopM y GSI en las estirpes PETRP+RP, PETRP+M53A, PETRP+M58A y PETRP+M53AM58A en respuesta a la adición de cantidades crecientes de cobre. Así, mediante Western Blot se determinó la respuesta a 500 nM de Cu (Figura 32A, 32B) y 1 μM de Cu (Figura 32C, 32D). Ante la concentración de cobre estándar (500 nM) se determinó que el mutante PETRP+M53AM58A presentaba un comportamiento similar al de la estirpe PETP y PETP+HAHA, ya que en esta estirpe se observó una expresión constitutiva de Cit_{c6} independientemente de si había o no cobre presente. Además, en ningún punto tras añadir cobre se detectó Pc, pese a que sí se indujo CopM en respuesta a este metal. Relativo a la expresión de PetR se comprobó que la cantidad de proteína no se alteraba, siendo mayor la cantidad de esta proteína que en la estirpe PETRP+PR incluso en medio BG11c-Cu (Figura 32A, 32B). Estos datos coincidían con los obtenidos empleando las membranas de *E. coli* transformada con los plásmidos pPHAB_Nat_petRP_M53A, pPHAB_Nat_petRP_M58A y pPHAB_Nat_petRP_M53A_M58A. (Figura 31). Sin embargo, los mutantes simples de una u otra metionina presentaron un fenotipo menos acusado que el de la estirpe PETP. A pesar de que ambos acumulaban PetR de forma constitutiva, tras añadir 500 nM de cobre (Figura 32B) la cantidad de esta

proteína resultó mucho menor a la observada para el doble mutante de las metioninas. Lo mismo se observó para la acumulación de Cit c₆ que sufrió un ligero descenso tras la adición de cobre. De hecho, en estos mutantes incluso se observó una ligera acumulación de Pc de forma dependiente de cobre. Ya que PetR sería un represor de *petE* en las estirpes mutantes PETRP+M53A y PETRP+M58A debe existir cierto grado de degradación del regulador que permita esta acumulación de Pc que no se daba en el mutante PETP (Figuras 18, 32A, 32B). Cuando la cantidad de cobre añadido fue mayor (1 μ M) la estirpe PETRP+M53AM58A volvió a presentar la misma acumulación de PetR y Cit c₆ constitutiva junto con la no acumulación de Pc (Figura 32C, 32D). Al ser mayor la cantidad de cobre añadido la degradación de PetR en la estirpe PETRP+RP ocurrió más rápidamente. Sin embargo, en estas condiciones las estirpes PETRP+M53A y PETRP+M58A presentaban una acumulación menor de PetR con respecto a los cultivos a los que se les añadió menos cobre (Figura 32D). En cualquier caso, esta disminución fue muy leve. El resultado más significativo en las estirpes PETRP+M53A y PETRP+M58A fue la menor acumulación de Cit c₆, donde la disminución tras la adición de cobre fue más acusada y, además, se observó una mayor acumulación de Pc (Figura 32C).

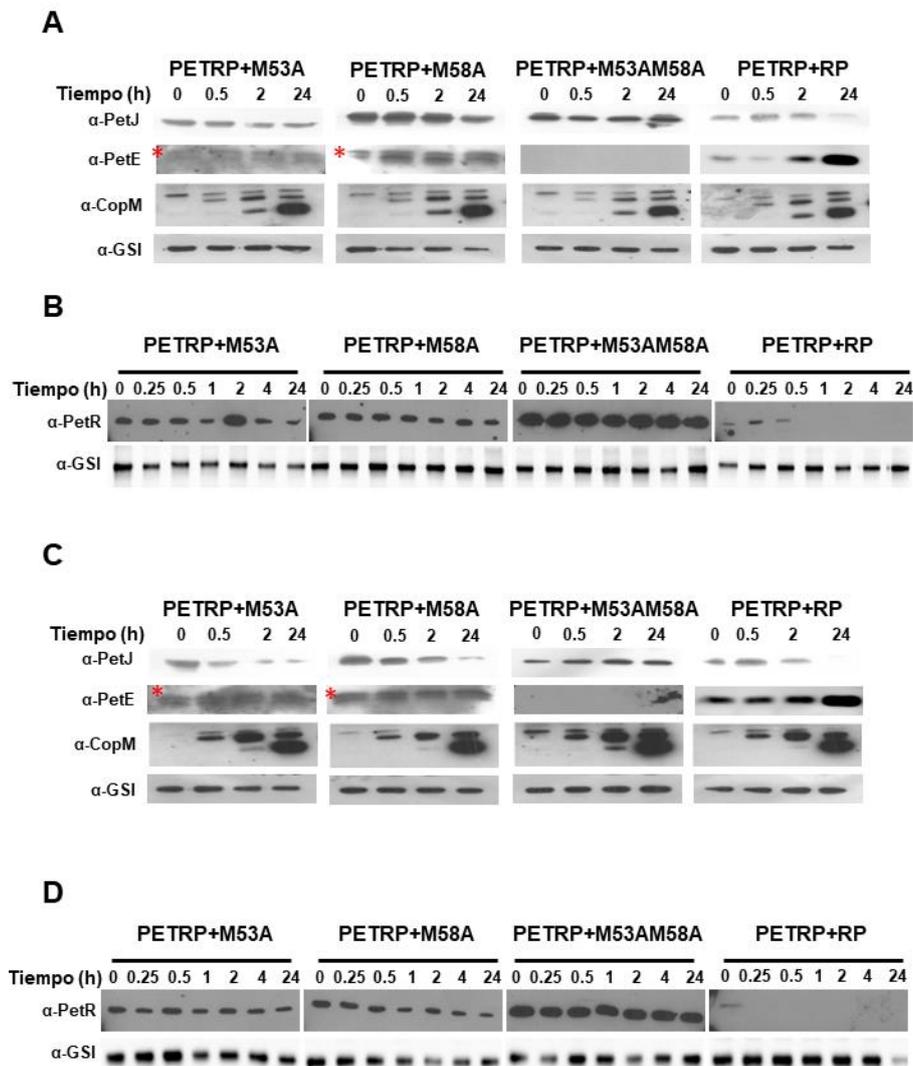


Figura 32. Determinación de los cambios en la respuesta proteica a cobre debido a la alteración de las metioninas M53 y/o M58. (A) Western Blot de PetJ, PetE, CopM y GSI en

las estirpes PETRP+M53A, PETRP+M58A, PETRP+M53AM58A y PETRP+RP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. La proteína total se aisló a los tiempos indicados tras esto. Se cargaron 5 µg de proteína total de los extractos solubles. **(B)** Western Blot de PetR y GSI en las estirpes PETRP+M53A, PETRP+M58A, PETRP+M53AM58A y PETRP+RP cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu. Tras esto las células fueron recogidas a los tiempos indicados y cargadas (0,2 DO_{750nm}). **(C)** Análisis mediante Western Blot igual al realizado en el apartado A. A los cultivos se les añadió 1 µM de Cu. **(D)** Análisis mediante Western Blot igual al realiza en el apartado B. A los cultivos se les añadió 1 µM de Cu. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Puesto que el anticuerpo frente a PetE genera una reacción cruzada con PetJ en caso de sobreexposición la banda correspondiente a PetE aparece remarcada con *. En todos los casos las proteínas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Esto, unido a los resultados anteriores, señaló que la capacidad de detectar cobre al alterar la metionina 53 o 58 se veía parcialmente comprometida mientras que al eliminar ambas PetP perdía esta capacidad. Por tanto, se determinó que ambas metioninas participan en el proceso por el cual PetP es capaz de percibir la presencia de cobre, siendo un proceso cooperativo que implica tanto a M53 como a M58.

5. Estudio de la interacción genética entre *petJ*, *petE*, *petR* y *petP*.

Con el fin de determinar que realmente no hubiera ningún transportador fotosintético de electrones alternativo a los canónicos Pc y Cit c₆ se intentó obtener una estirpe carente de ambas proteínas. Para esto se generó un plásmido que permitiera obtener una estirpe donde no se expresara *petJ*, el plásmido pPETJ_Cm. Con este se transformaron tanto la estirpe silvestre como la estirpe PETE (Giner-Lamia et al., 2012), generándose así las estirpes PETJ y PETEJ (Figura 33A). Sin embargo, la estirpe que carecería de ambos transportadores a pesar de encontrarse totalmente segregada para la inserción en *petE* (Figura 33E) no segregó la inserción en *petJ* ni tras más de 2 años mantenida en presencia del antibiótico de selección (Figura 33B). Esto sugiere que no debe existir un tercer transportador fotosintético de electrones en el lumen tilacoidal. Igualmente, esto plantea la cuestión de si podría ser factible sobre un mutante *petRP*. Para comprobarlo se generaron los mutantes PETER, PETEP, PETERP (Figura 33C) y PETJR, PETJP, PETJRP (Figura 33D). Ya que estos mutantes se habían generado mediante la transformación de PETE y PETJ con los plásmidos adecuados se verificó la segregación del operón *slr0240-41* en los mismos. De forma que solo fueron capaces de segregar PETJR y PETJRP, es decir aquellos que expresaban constitutivamente *petE*, y PETEP, es decir aquel que expresaba constitutivamente *petJ*. Concluyendo que no es posible obtener un mutante carente de ambos transportadores a pesar de estudios muy anteriores a este que aseguran que *Synechocystis* puede crecer sin ambos (Zhang et al., 1994).

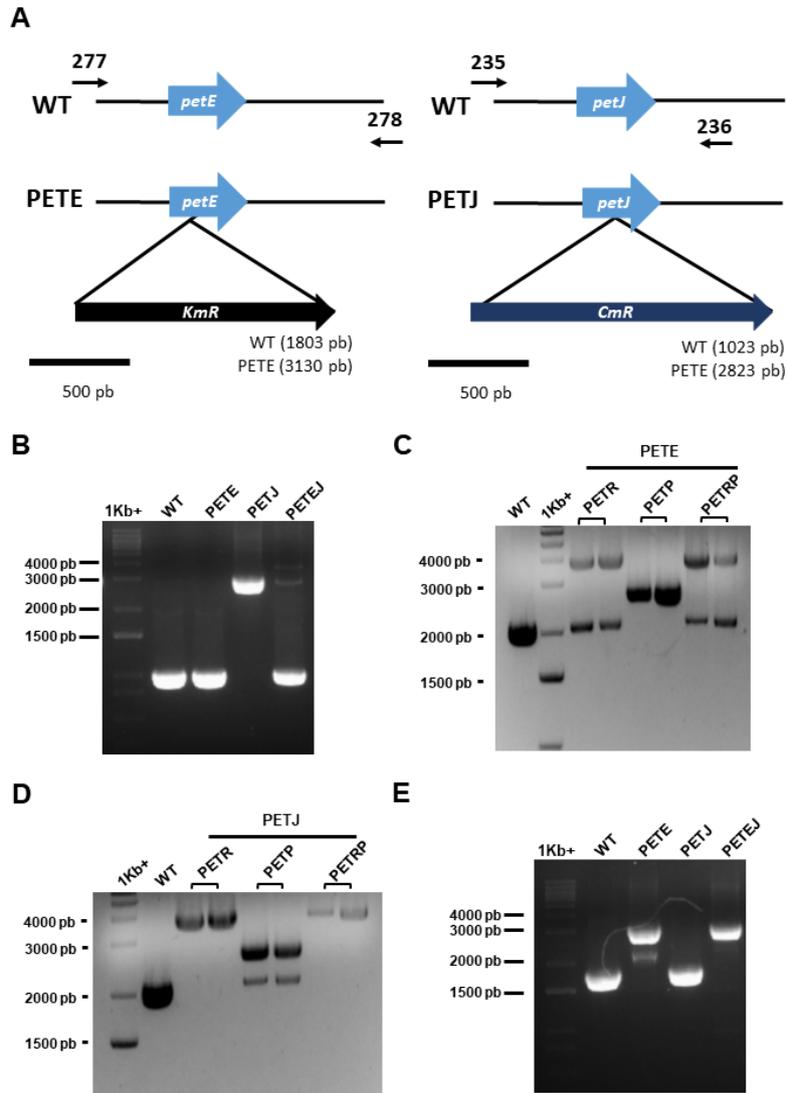


Figura 33. Comprobación de la segregación de las estirpes PETJ, PETE, PETEJ, PETER, PETEP, PETERP, PETJR, PETJP y PETJRP. (A) Esquema de la región genómica *petE* y *petJ* en la estirpe WT (silvestre) y los mutantes PETE y PETJ. **(B)** Análisis mediante PCR de la segregación de *petJ* usando los oligonucleótidos 235-236. **(C)** Análisis mediante PCR de la segregación de *slr0240-41* en los mutantes generados sobre fondo PETE usando los oligonucleótidos 223-248. **(D)** Análisis mediante PCR de la segregación de *slr0240-41* en los mutantes generados sobre fondo PETJ usando los oligonucleótidos 223-248. **(E)** Análisis mediante PCR de la segregación del gen que lo codifica para *petE* usando los oligonucleótidos 277-278.

5.1. Estudio de los cambios fisiológicos de los mutantes PETJ y PETE.

Puesto que los niveles de expresión en la estirpe silvestre de *petJ* en medio con cobre y de *petE* en medio sin cobre parecen despreciables (Figura 15) se procedió a analizar el crecimiento de las estirpes mutantes generadas. Para ello se realizaron diluciones seriadas de las mismas donde de una dilución a otra la cantidad de células disminuía del orden de 10 veces. Estas estirpes, que provenían de un cultivo exponencial en BG11c-Cu, se cultivaron en placas con medio BG11c (330 nM Cu), BG11c-Cu (~30 nM Cu) o BG11c-Cu+BCSA (no hay cobre disponible) y se analizó su crecimiento (Figura 34A). De esta forma se determinó que la estirpe PETE, a

pesar de ser capaz de crecer en un medio donde haya una alta disponibilidad de cobre, presenta un importante retraso con respecto a la estirpe silvestre, esto fue menos acusado en la estirpe PETEP. Ya que los mutantes PETP expresan constitutivamente *petJ* (Figura 18) esto debe deberse a la presencia constante de Cit c_6 . De igual forma la estirpe PETJ presentaba un ligero retraso respecto a la estirpe silvestre en medio sin cobre disponible. Este retraso también fue menos acusado en las estirpes PETJR y PETJRP, probablemente por el mismo motivo.

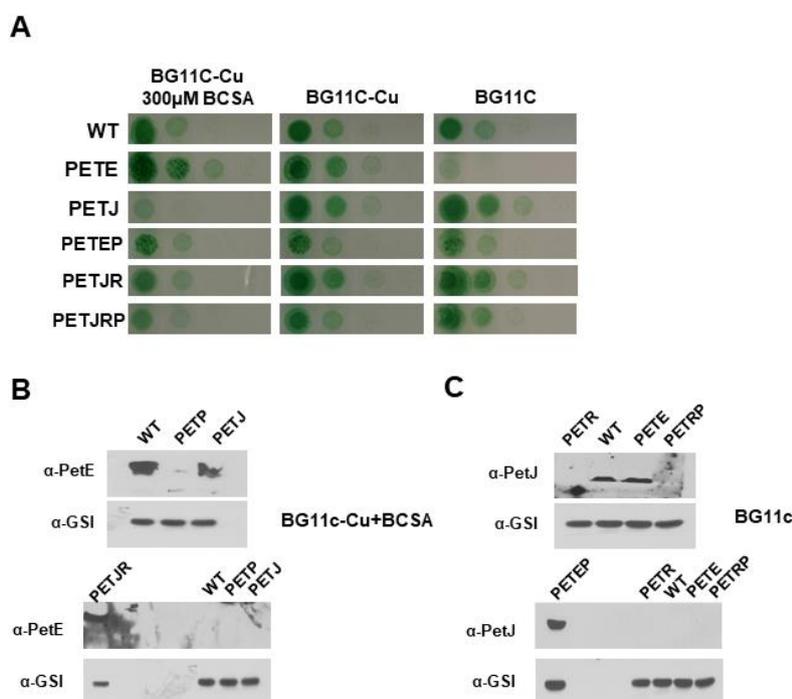


Figura 34. Análisis del crecimiento de las estirpes PETE, PETJ, PETEP, PETJR y PETJRP ante diferente disponibilidad de cobre. (A) Crecimiento de las estirpes en medio sólido con diferente disponibilidad de cobre a $50 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; los cultivos en fase exponencial de cada una de las estirpes se igualaron a $\text{DO}_{750 \text{ nm}}$ de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose 5 μl de cada una. **(B)** Análisis de los niveles de PerE y GSI mediante Western Blot en las estirpes WT (silvestre), PETP, PETJR y PETJ cultivadas en BG11c-Cu+300 μM BCSA burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . Se cargaron 150 μg de proteína total de un extracto soluble. Estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(C)** Análisis de los niveles de PetJ y GSI mediante Western Blot en las estirpes WT (silvestre), PETR, PETRP, PETEP y PETE cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . La carga y separación de las proteínas se realizó como en el apartado B. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

El hecho de que los mutantes PETE y PETJ fueran capaces de crecer en un medio con cobre y sin cobre disponible, aunque a tasas reducidas (Figura 34A), sugería que en estas condiciones ambas estirpes debían tener un nivel mínimo del otro transportador. Para verificar esto se comprobó mediante Western Blot la presencia de Pc en el mutante PETJ que había crecido en medio BG11c-Cu+BCSA y la presencia de Cit c_6 en el mutante PETE que había crecido en medio BG11c (Figura 34B, 34C). Esto verificó que, tanto en estas estirpes como en la estirpe silvestre, para cada una de las condiciones estudiadas está presente uno u otro transportador. Por lo que en medio sin disponibilidad de cobre hay una cantidad baja de Pc tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe PETJ, mientras que en medio con cobre

disponible se acumulaba una cantidad baja de Cit c_6 tanto en la estirpe silvestre como en PETE. Lo cual explica el crecimiento en dichas condiciones de los mutantes. Sin embargo, la cantidad de Pc en el mutante PETP que había crecido en medio BG11c-Cu+BCSA o de Cit c_6 en los mutantes PETR y PETRP que habían crecido en BG11c estaba fuera de los límites de detección. Mediante este experimento también se ratificó que en medio sin cobre disponible la estirpe PETJR tiene una alta acumulación de plastocianina, muy superior a la de la estirpe silvestre (Figura 34B), mientras que en medio con cobre disponible la estirpe PETEP tiene una alta acumulación de citocromo, muy superior a la de la estirpe silvestre (Figura 34C).

6. Estudio a nivel fisiológicos del efecto de la presencia o ausencia de cobre en mutantes del sistema PetRP.

Debido al cambio en el patrón de expresión de los genes *petJ* y *petE* en las estirpes PETR y PETP y la variación en el crecimiento de las estirpes PETJ y PETE, respecto a la estirpe silvestre, se procedió a estudiar aspectos fisiológicos de los mutantes que carecían del sistema de regulación. Puesto que anteriores estudios, además de los datos plasmados en la Figura 34, desvelaron la dificultad para crecer de mutantes carentes de plastocianina y citocromo c_6 en medio con cobre y sin cobre respectivamente (Durán et al., 2004) se esperaba obtener resultados similares para los mutante PETR y PETP (Figuras 15, 18). Por tanto, se procedió a determinar si se producían cambios en el crecimiento o la capacidad fotosintética de estas estirpes en distintas condiciones de disponibilidad de cobre.

6.1. Efectos sobre en crecimiento.

Para estudiar el efecto del cobre sobre el crecimiento de estirpes PETR, PETRP y PETP estas, junto a la estirpe silvestre, se cultivaron en la misma manera a la descrita en la sección 5.1. y se siguió su crecimiento (Figura 35A). De forma similar a lo observado en el mutante PETJ en un medio sin cobre disponible (BG11c-Cu+BCSA) (Figura 34A), PETR y PETRP presentaron un retraso en el crecimiento con respecto al resto de estirpes. Sin embargo, si la disponibilidad de cobre era baja ninguna de estas estirpes presentó un efecto en condiciones de iluminación estándar ($\sim 50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Al igual que en estudios anteriores las estirpes PETRP y PETR fueron indistinguibles entre ellas. A diferencia del mutante PETE, la estirpe PETP no presentó un retraso en el crecimiento ni siquiera en medio BG11c (Figuras 34A, 35A), lo cual es debido a que esta estirpe expresa *petJ* constitutivamente, por lo que podría usarlo como transportador incluso en presencia de cobre (Figura 18). Aunque los niveles de citocromo c_6 en la estirpe PETP son menores en medio BG11c que en medio BG11c-Cu+BCSA (Figura 20) esta cantidad del transportador debe ser suficiente para no afectar al crecimiento (Figura 35).

Tanto Pc como Cit c_6 son necesarios para la reducción del PSI y, por tanto, para que la fotosíntesis ocurra eficientemente. De forma que se analizó si la alteración en el crecimiento era más acusada a una luz de crecimiento mayor ($500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), ya que en esta condición se requiere una mayor tasa de transporte fotosintético. De forma que, ante esto, la presencia de una concentración mayor de

estos transportadores podría ser más necesaria y, por tanto, podría reflejarse un efecto en el crecimiento que no se observaba a una menor intensidad de luz (Figura 35A) si se reflejase a una mayor luz de crecimiento (Figuras 35B, 35C). Para ello cultivos de las estirpes silvestre, PETE, PETJ, PETR y PETP que habían crecido en medio BG11c-Cu se diluyeron en medio BG11c o BG11c-Cu+BCSA y una vez habían alcanzado la fase exponencial se volvieron a diluir a una DO_{750nm} 0,2. Tras esto se analizó el crecimiento de los cultivos en ambas condiciones en tiempos cortos (7 y 24 horas). Se determinó que en condiciones donde no había disponibilidad de cobre tanto el mutante PETJ como el mutante PETR presentaban un retraso en el crecimiento que era similar en ambas estirpes (Figura 35B). Por otro lado, cuando había cobre en el medio el mutante PETE presentó una disminución del crecimiento muy acusada, siendo la mitad del de la estirpe silvestre. En estas mismas condiciones el mutante PETP presentó un ligero retraso respecto a la estirpe silvestre, algo que no se observaba en las anteriores condiciones (Figura 35A, 35D). Ya que en estas condiciones PETP expresaba *petJ* a pesar de haber cobre disponible (Figura 18), esto sugiere que una diferencia en la eficiencia de Cit c_6 respecto a Pc o que la cantidad de Cit c_6 en la estirpe PETP en medio con cobre era menor a la cantidad de Pc en la estirpe silvestre en estas condiciones.

6.2. Efectos sobre la fotosíntesis.

Para profundizar sobre los cambios fisiológicos que sufren las distintas estirpes donde la expresión de *petJ* y *petE* se había visto alterada se estudió su capacidad fotosintética utilizando un electrodo de oxígeno. Ya que ambas proteínas son transportadores de la cadena de transporte electrónica se esperaba que la capacidad fotosintética de estas estirpes se viera afectada dependiendo de la disponibilidad de cobre en el medio. Por tanto, se realizaron medidas del desprendimiento de oxígeno a intensidades luminosas crecientes de estirpes que se encontraban en fase exponencial en medio BG11c o medio BG11c-Cu+BCSA (Figuras 35D, 35E). A luz saturante los mutantes PETJ, PETJR y PETR, en condiciones donde el medio no presentaba ninguna disponibilidad de cobre, tuvieron una ratio de evolución de oxígeno menor ($16,8 \pm 0,3 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$, $14,9 \pm 1,44 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$ y $18,9 \pm 0,75 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$ respectivamente) que las estirpes silvestre ($23 \pm 3,82 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$), PETE ($24,5 \pm 2,46 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$), PETP ($23,2 \pm 5 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$) y PETEP ($22,2 \pm 1,64 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$), a pesar que la saturación se produce a la misma intensidad de luz de ($245 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Cuando la disponibilidad de cobre era alta la estirpe PETE mostraba una gran disminución en su evolución de oxígeno alcanzando solo $5,3 \pm 2,7 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$ y saturándose a $180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; las estirpes PETP y PETEP también presentaron una menor capacidad fotosintética ($13,24 \pm 2,63 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$ y $13,6 \pm 1,56 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$ respectivamente) que el resto de estirpes (silvestre ($24,11 \pm 3,66 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$), PETJ ($22,25 \pm 4,34 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$), PETR ($21,87 \pm 4,36 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$) y PETJR ($19,8 \pm 3,46 \mu\text{mol min}^{-1}/DO_{750nm}$)), a pesar de saturar a la misma intensidad luminosa ($245 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) que el resto de estirpes analizadas. Por lo que en presencia de cobre el mutante más afectado fue PETE, posiblemente porque solo presentaba niveles reducidos de Cit c_6 . Estos resultados coincidieron con los datos de crecimiento a alta luz, donde el más afectado sería el mutante PETE y, pese a expresar de forma

constitutiva *Cit c₆*, cuando la intensidad luminosa era alta también se veía afectada la estirpe PETP. En concordancia con el crecimiento (Figura 35F), las estirpes PETR y PETJ presentaron una menor capacidad fotosintética, respecto a la estirpe silvestre, cuando no había cobre disponible; siendo en PETJ un poco más acusado (Figuras 34A, 35A, 35D). Puesto que PETR expresaba de forma constitutiva *petE* (Figura 15) el retraso debería deberse a una incapacidad de sintetizar una proteína funcional sin cobre en el medio.

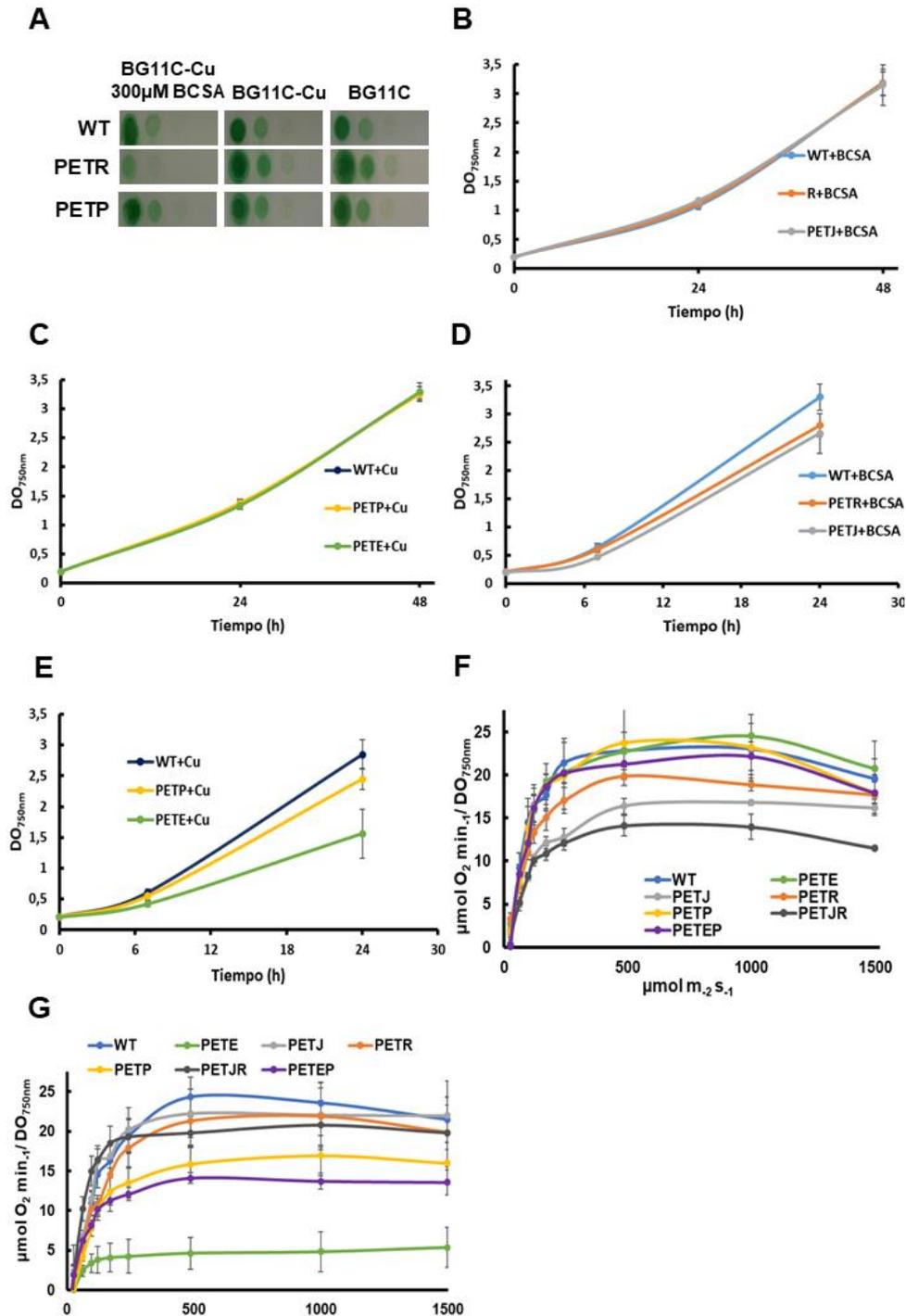


Figura 35. Análisis del crecimiento y la capacidad fotosintética de distintas condiciones de disponibilidad de cobre para las estirpes PETR, PETP, PETJ, PETE, PETEP y PETJR. (A) Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), PETR, PETP y PETR en medio sólido con

diferentes disponibilidades de cobre a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; cultivos en fase exponencial de cada una de las estirpes se igualaron a DO_{750} nm de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose $5 \mu\text{l}$ de cada una. **(B)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), PETJ y PETER en condiciones donde no hay disponibilidad (BG11c-Cu + $300 \mu\text{M}$ BCSA) de cobre a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(C)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), PETE y PETP en condiciones con alta disponibilidad (BG11c) de cobre a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(D)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), PETJ y PETER en condiciones con alta disponibilidad (BG11c) de cobre a $500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(E)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), PETE y PETP en condiciones donde no hay disponibilidad (BG11c-Cu + $300 \mu\text{M}$ BCSA) de cobre a $500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(F)** Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), PETJ, PETE, PETER, PETP, PETJR y PETEP medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes en cultivos que se encontraban en fase exponencial ($\text{DO}_{750}=0,5-1$) en medio BG11c-Cu+BCSA burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . Para PETE se realizaron 5 repeticiones y 4 para la estirpe WT (silvestre). **(G)** Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), PETJ, PETE, PETER, PETP, PETJR y PETEP cultivadas en medio BG11c. Las características del ensayo son iguales al del apartado D. Las barras de error corresponden al error estándar de las mismas

7. Análisis del sistema *petRP* en la cianobacteria filamentosa *Anabaena*.

Puesto que gracias a los diferentes análisis realizados se ha establecido este mecanismo de regulación en respuesta a cobre en *Synechocystis* se procedió a estudiar si esto era extensible para otras cianobacterias que contaran con los genes implicados en el mismo. Para comprobar esto se analizó el intercambio *petE/petJ* y la relación de este con el sistema PetR-PetP en la cianobacteria filamentosa y fijadora de nitrógeno *Anabaena* sp. PCC 7120. En *Anabaena* podemos encontrar una proteína homóloga y que pertenece a la misma familia que PetR de *Synechocystis*, esta es la proteína codificada por el gen *alr2569*. Formando un operón con este gen se encuentra el gen *alr2570*, proteína homóloga y de la misma familia que PetP. PetP en *Anabaena*, de igual forma que en *Synechocystis*, cuenta con 4 regiones transmembrana, aunque se predice que contaría con dos pequeñas hélices reentrantes entre la tercera y cuarta región transmembrana (Figura 36A). Sin embargo, en lo relativo al citocromo c_6 hay diferencias respecto a *Synechocystis* ya que *Anabaena* no solo presenta un gen que codifica para el mismo, *alr4251*, sino que presenta dos variantes de la proteína. De modo que en esta estirpe además se encuentra el citocromo c_{6-2} , codificado por el gen *all0161* (Reyes-Sosa et al., 2011; Pessarakli, 2018), que es capaz de reducir al PSI pero de forma menos eficiente que el citocromo c_6 y la plastocianina (Reyes-Sosa et al., 2011) y, además, el citocromo c_{6-3} (codificado por el gen *asl0256*). El citocromo c_{6-3} se encuentra solo en cianobacterias formadoras de heterocistos o en aquellas cianobacterias que han perdido la capacidad de formarlos, pero en el pasado contaban con ella. En estas cianobacterias el citocromo c_{6-3} se encuentra en células vegetativas, su expresión es independiente de cobre y se cree que podría estar implicado en la diferenciación a heterocistos (Torrado, 2017; Torrado et al., 2017). Además, *Anabaena* también presenta un gen, *all0258*, que codifica para la plastocianina. Al analizar la disposición de estos genes en *Anabaena* se observaba que el gen que codifica para la plastocianina se encuentra aguas abajo del gen que codifica para el citocromo c_{6-3} (Figura 36B).

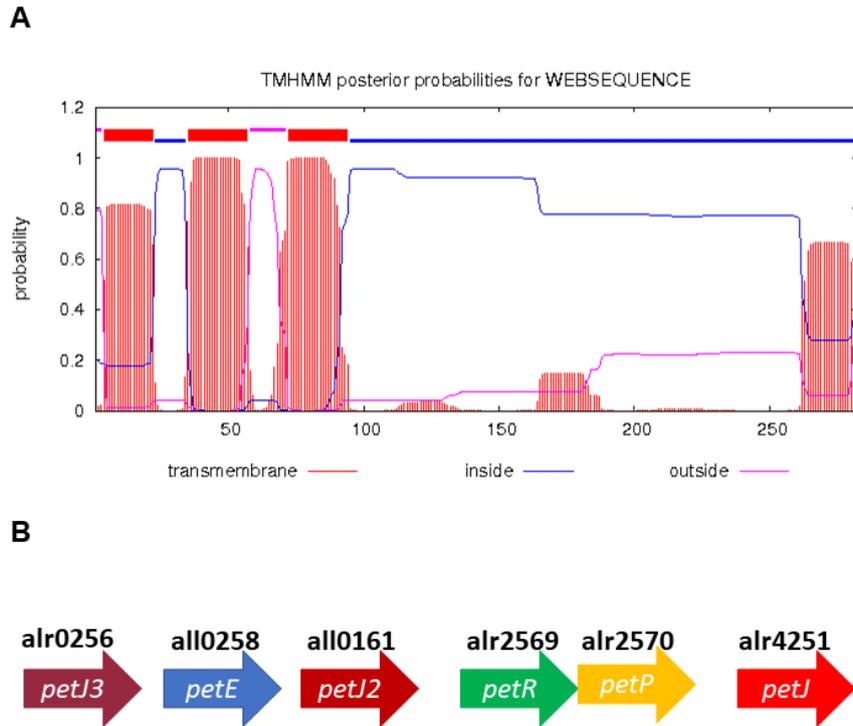


Figura 36. Estructura tridimensional de PetP en *Anabaena* y contexto genético de los genes que codifican para PetR, PetP, plastocianina y los citocromos c_6 . (A) Análisis empleando TMHMM de la proteína PetP. Las zonas representadas en rojo corresponderían a segmentos transmembrana. (B) Representación esquemática de la distribución de los genes del citocromo c_{6-3} (*petJ3*), plastocianina (*petE*), citocromo c_{6-2} (*petJ2*), PetR, PetP y citocromo c_6 (*petI*). Solo el operón *petRP* está contiguo en el genoma de la cianobacteria.

6.1. Generación de los mutantes PETP y PETR

Para estudiar la conservación de este mecanismo de regulación se generaron los mutantes de *Anabaena* tanto de la proteasa (PETP_An) como del regulador (PETR_An). Para obtener la estirpe PETR_An se transfirió el plásmido pCSRO delta_An_petR a *Anabaena* siguiendo el protocolo de conjugación triparental descrito en el apartado 2.3.3. de Materiales y Métodos (Figura 37A). Tras una primera selección en presencia de espectinomicina (Sp), hasta su completa segregación, se llevó a cabo un segundo paso para seleccionar las colonias que eran dobles recombinantes. De forma que estas serían resistentes a sacarosa y sensibles a Sp, posteriormente estas se comprobaron mediante PCR (Figura 37). Para generar el mutante PETP_An se siguió la misma estrategia, pero empleando el plásmido pCSRO_delta_AnpetP_Nat, de forma que este contiene un gen de resistencia a Nat interrumpiendo el gen *alr2570* (Figura 37B). La segregación completa de ambas estirpes se comprobó mediante PCR (Figuras 37C, 37D), determinándose, por tanto, que era posible obtener el mutante de cada una de estas proteínas también en *Anabaena*.

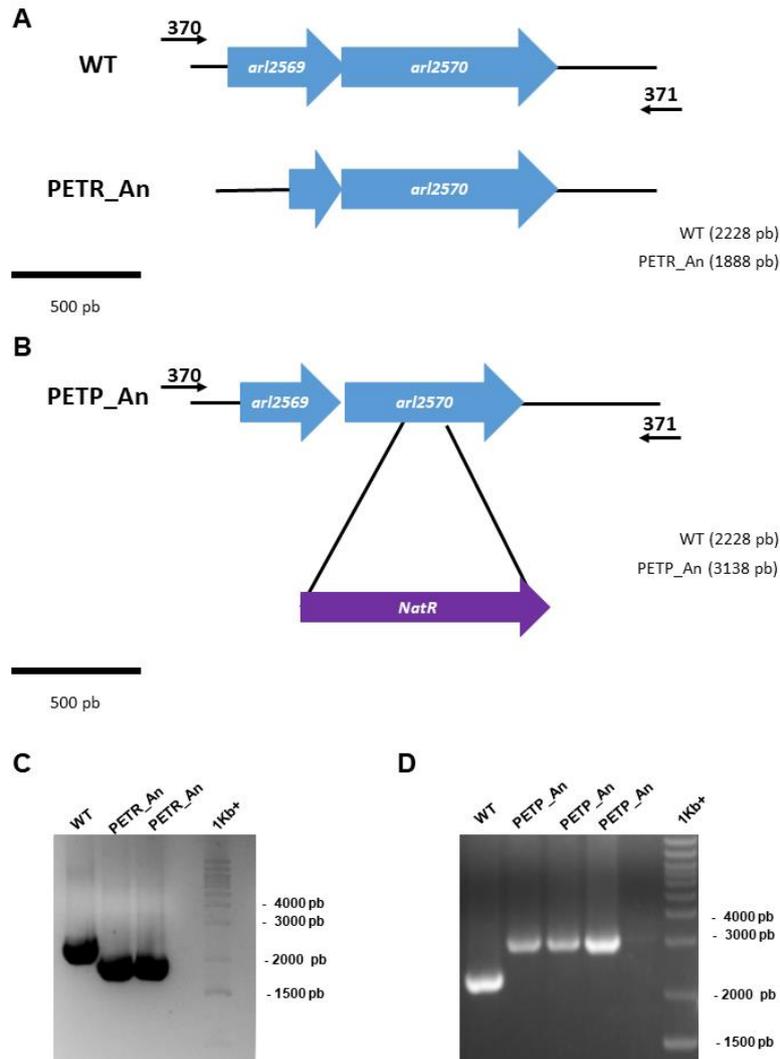


Figura 37. Construcción de las estirpes PETS_An y PETS_An. (A) Representación esquemática de la región génica de *alr2569-70* en la estirpe silvestre de *Anabaena* y el mutante PETS_An. (B) Representación esquemática de la región génica de *alr2569-70* en la estirpe silvestre de *Anabaena* y el mutante PETS_An. (C) Análisis mediante PCR de la segregación de *alr2569* en el mutante PETS_An usando los oligonucleótidos 370-371. (D) Análisis mediante PCR de la segregación de *alr2570* en el mutante PETS_An usando los oligonucleótidos 370-371.

6.2. Caracterización de los mutantes en el sistema *petRP* de *Anabaena*.

Con el fin de determinar si en esta cianobacteria también se mantiene la regulación por cobre de PetR mediada por PetP se realizó el experimento que se había realizado para comprobar la respuesta del mutante PETS a la adición de cobre (Figura 15) empleando las estirpes silvestres, PETS_An y PETS_An. Analizando su expresión génica mediante Northern Blot y proteica mediante Western Blot (Figura 38). En este caso el tampón de rotura empleado en las muestras utilizadas para Western Blot contenía, además, 5% de glicerol y 1 mM de EDTA. Con el objetivo de evitar la degradación de PetR al romper las células para obtener los extractos proteicos.

De forma que mediante el análisis de la expresión génica se determinó que, al igual que ocurre en *Synechocystis*, el intercambio *petJ/petE* en respuesta a cobre era

dependiente de la presencia de PetR y PetP. En el mutante PETR_An nunca se expresaba *petJ* ni siquiera en medio con una baja disponibilidad de cobre (BG11-Cu), condición en la que sí se expresaba en la estirpe silvestre. Además, en este mutante la expresión de *petE* era constitutiva, independientemente de la presencia o no de cobre en el medio (Figura 38A); la expresión de *petE* en la estirpe silvestre se observaba solo tras la adición de cobre. De hecho, como ocurría en *Synechocystis* en el mutante PETS_An el efecto fue el contrario al del mutante PETR_An. En PETS_An *petJ* se expresó constitutivamente, aunque hubiera cobre en el medio (Figura 38A) y no se observó expresión de *petE*, incluso tras 24 horas de la adición de cobre. Estos resultados son similares a los obtenidos en *Synechocystis* (Figuras 15 y 18), indicando que este mecanismo y su funcionamiento están conservados en aquellas cianobacterias que presentan los genes *petJ*, *petE* y *petRP*.

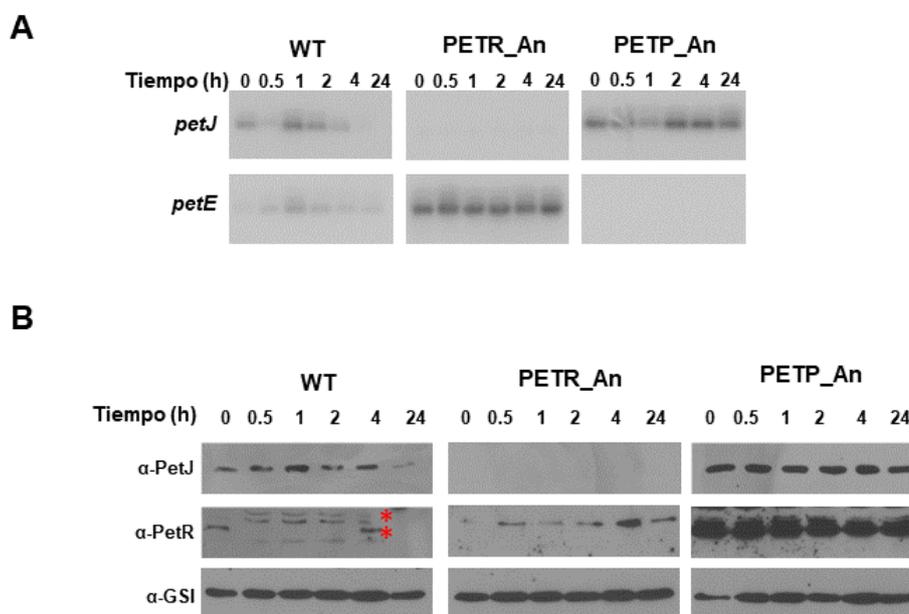


Figura 38. Análisis del sistema de regulación PetR-PetP y su control en el intercambio *petJ/petE* ante cobre en *Anabaena*. (A) Análisis mediante Northern Blot de *petE* y *petJ* en las estirpes silvestre, PETR_An y PETS_An. Los filtros con el RNA aislado se hibridaron con las sondas para *petE*, *petJ* y *copM* y posteriormente se rehibridó con la sonda de *mpB*. **(B)** Western Blot de PetJ, PetR y GSI en las estirpes de *Anabaena* silvestre, PETR_An y PETS_An. Se cargaron 5 μ g totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. El símbolo * señala la banda específica de PetR. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. En ambos casos las células fueron cultivadas en medio BG11-Cu burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ y se tomaron las muestras a los tiempos indicados tras añadir 500 nM de Cu. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Respecto a la acumulación de estas proteínas solo se estudiaron los niveles de Cit c₆ y PetR puesto que debido a las diferencias entre la plastocianina de *Anabaena* y *Synechocystis* los anticuerpos empleados anteriormente no detectaban la proteína de *Anabaena*. El resultado fue similar (Figura 38B) al observado para *Synechocystis* (Figuras 15, 18). En la estirpe silvestre se observaba una degradación de PetR

dependiente de cobre, algo que no ocurrió en la estirpe PETP_An, en la estirpe PETR_An no se detectó PetR en ninguna condición. Por tanto, en esta cianobacteria también sería la proteasa la encargada de catalizar la proteólisis de PetR en respuesta a cobre. El que PetR no disminuyera ante la presencia de cobre en PETP_An correlaciona con una acumulación de Cit c₆ en esta estirpe respecto a la silvestre, mientras que en PETR_An Cit c₆ no está presente (Figura 38B). Esto que apoyaba que su expresión estaría activada por el regulador. Sin embargo, algo diferencial en *Anabaena* con respecto a *Synechocystis* fue que para esta misma cantidad de cobre añadido PetR reaparece tras 24 horas de exposición a cobre, mientras que este fenómeno en *Synechocystis* solamente ocurría a concentraciones menores (Figura 13). Por tanto, el tiempo de activación de la proteasa sería menor en esta cianobacteria o la cantidad de cobre efectiva en ambos organismos debe diferir ante una misma concentración exterior. Este hecho coincidió con la menor disminución en la cantidad de Cit c₆ en la estirpe silvestre de *Anabaena* (Figura 38B), semejante a lo que sucede en *Synechocystis* para menor cantidad de cobre añadido (Figura 13).

Por tanto, en una cianobacteria diazotrófica como *Anabaena* parece ser que el regulador controla de forma dependiente de cobre la expresión de los genes *petE* y *petJ*. Esta proteína activa la expresión de *petJ* y reprime al gen *petE* y, a su vez, sería degradada por PetP ante la presencia de cobre en el medio.

**B. Estudio funcional y
caracterización de las
FBPasas de *Synechocystis*
*sp. PCC 6803.***

1. Análisis fenotípico y fisiológico de los mutantes de la FBPasa y FBP/SBPasa en *Synechocystis*.

La actividad FBPasa en organismos fotosintéticos está implicada tanto en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato como el ciclo CBB y la actividad SBPasa está implicada exclusivamente en el ciclo CBB. En cianobacterias, a diferencia de plantas, no existe una compartimentalización y separación de los procesos entre cloroplasto (Ciclo CBB) y citoplasma (ruta PPP). Por tanto, el estudio de la regulación y relación de estas proteínas de cianobacterias respecto a estos procesos es necesaria. Las cianobacterias, presentan una enzima doble que presenta tanto actividad FBPasa como SBPasa (FBP/SBPasa). Algunas cianobacterias (incluida *Synechocystis*) además presentan una enzima con actividad FBPasa exclusivamente (FBPasa) (Tamoi et al., 1998). Por tanto, se han realizado estudios para profundizar el conocimiento sobre la regulación y esencialidad de estas actividades

1.1. Determinación de los niveles de ambas proteínas ante distintas condiciones de crecimiento.

Como primera aproximación para conocer los posibles procesos en los que podrían estar implicadas ambas enzimas se realizó la cuantificación de los niveles de ambas en distintas condiciones de crecimiento. Para esto se cultivó la estirpe silvestre en diferentes condiciones respecto a la disponibilidad de carbono y/o luz. De forma que durante 30 horas esta estirpe creció en un medio con limitación de carbono (BG11 sin suplementación de carbono y $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), condiciones estándar de crecimiento (BG11c con suplementación de carbono al 1% y $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), alto carbono (BG11c con suplementación de carbono al 3% y $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), oscuridad (BG11c con suplementación de carbono al 1% y $0 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), alta luz (BG11c con suplementación de carbono al 1% y $185 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), baja luz (BG11c con suplementación de carbono al 1% y $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mixotrofia (BG11c con suplementación de carbono al 1%, glucosa 10 mM y $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y fotoheterotrofia (BG11c con suplementación de carbono al 1%, glucosa 10 mM, DCMU 50 μM y $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En estos cultivos se determinó la cantidad de ambas proteínas mediante Western Blot (empleando los anticuerpos obtenidos previamente por el laboratorio), utilizando como valor de referencia las condiciones de cultivo estándar. De forma general, los niveles de proteína permanecen constantes independientemente de las condiciones de crecimiento, observándose solo un aumento de ambas cuando la cantidad de carbono estaba limitada (Figura 39).

Por tanto la cantidad de estas enzimas permanece constante de forma general, aunque la actividad FBPasa total aún podría variar por su regulación, como ocurre en las enzimas de plantas (Michelet et al., 2013). Por tanto, que no hubiera grandes diferencias en la cantidad de ambas enzimas no significa que las actividades FBPasa y SBPasa permanezcan constantes en estas condiciones.

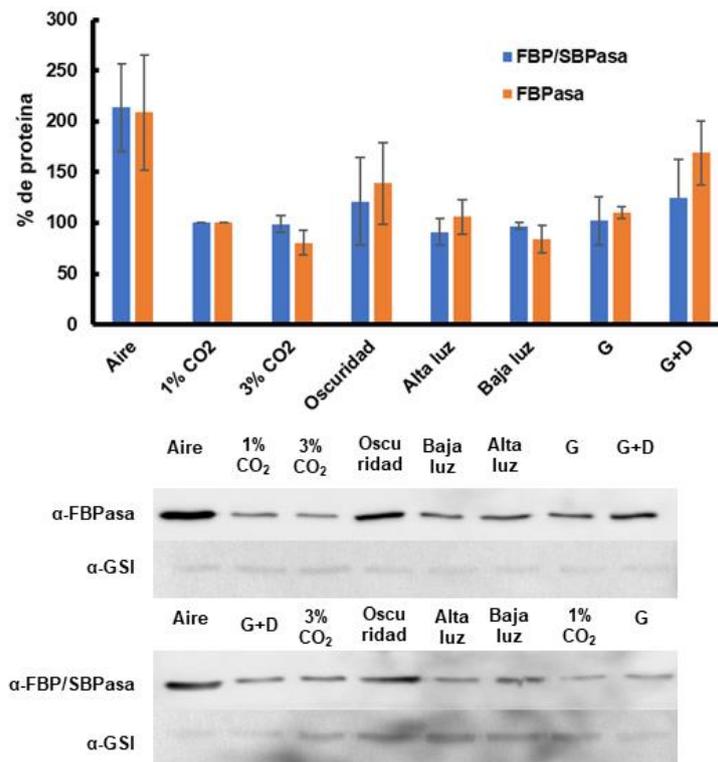


Figura 39. Regulación de la cantidad de FBP/SBPasa y FBPasa dependiente de las condiciones de luz y carbono. mediante por Western Blot de la cantidad de FBP/SBPasa o FBPasa con respecto a la cantidad de las mismas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (μE). G hace referencia a medio BG11c con 10 mM de glucosa (mixotrofia) y G+D a medio BG11c con 10 mM de glucosa y 50 μM de DCMU (fotoheterotrofia). Se cargaron 5 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estos se separaron mediante un gel al 10% de SDS-PAGE. A menos que se indique el porcentaje de carbono burbujeado corresponden al 1% (vol/vol) de CO₂. El cultivo realizado aire se tamponó con 10 mM pH 7,5 TES-NaOH. Los resultados se normalizaron con la cantidad de GSI. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de las mismas. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

1.2. Estudio de los mutantes ΔF y $\Delta\text{F/S}$.

Para determinar la importancia de ambas enzimas en *Synechocystis* se realizó el análisis fenotípico y fisiológico de los mutantes carentes de la enzima bifuncional ($\Delta\text{F/S}$; *slr2094::Ery^R*; Tabla 1) (García-Cañas, 2015) o de la enzima que solo presentaba actividad FBPasa (ΔF ; *slr0952::Sp/St^R*; Tabla 1). La segregación de las estirpes se comprobó mediante PCR y la no expresión de la FBPasa en el mutante ΔF y de la FBP/SBPasa en el mutante $\Delta\text{F/S}$ se comprobó mediante Western Blot (Figura 40). El mutante $\Delta\text{F/S}$ solo segregaba ante la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Yan y Xu, 2008; García-Cañas, 2015). Sin embargo, el doble mutante carente de ambas enzimas no segregaba en ninguna de las condiciones de cultivo empleadas (Figura 40A). Para analizar en mayor detalle el comportamiento de estas estirpes se cultivaron en condiciones de fotoautotrofia, mixotrofia o fotoheterotrofia; midiéndose su crecimiento (como $\text{DO}_{750\text{nm}}$), acumulación de clorofila y capacidad de crecer en dichas condiciones. En todos los casos las

estirpes provenían de cultivos sólidos donde ya estaban adaptadas a mixotrofia y los preinóculos de cultivos líquidos también crecieron en condiciones de mixotrofia. Este proceso de preadaptación se realizó para asegurar que las posibles diferencias en el crecimiento realmente se debieran a cambios en el metabolismo debidos a las características de cada estirpe y no a una alteración en la capacidad de adaptarse a glucosa.

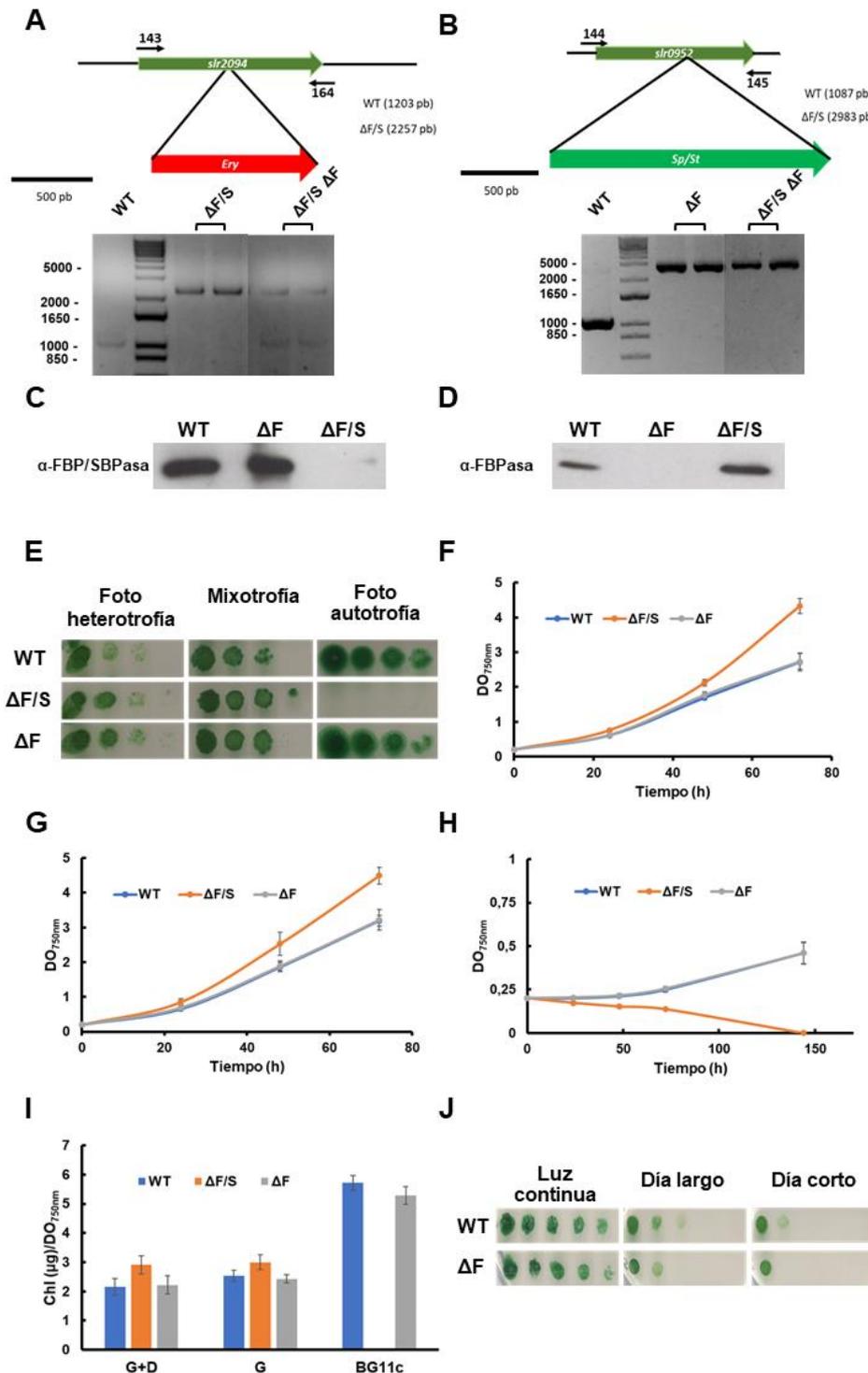


Figura 40. Crecimiento de los mutantes ΔF y $\Delta F/S$ en diferentes condiciones de disponibilidad de carbono y luz. (A) Representación esquemática de la región genómica *slr2094* en la estirpe WT (silvestre) y el mutante de inserción $\Delta F/S$. Comprobación de la

segregación de $\Delta F/S$ y de la estirpe $\Delta F/S\Delta F$ cultivados en mixotrofia mediante PCR con los oligonucleótidos 143 y 164. **(B)** Representación esquemática de la región genómica *slr0954* en la estirpe WT (silvestre) y el mutante de inserción ΔF . Comprobación de la segregación de ΔF cultivado en mixotrofia mediante PCR con los oligonucleótidos 144 y 145. **(C)** Análisis mediante Western Blot de la enzima FBP/SBPasa en las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF cultivadas en mixotrofia. Se cargaron 5 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(D)** Western Blot de la enzima FBPasa realizado de igual forma al del apartado C. **(E)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en diferentes condiciones tróficas: fotoautotrofia, mixotrofia o fotoheterotrofia (con 10 mM de glucosa y 0,05 mM de DCMU). Los cultivos en fase exponencial de cada una de las estirpes se igualaron a $DO_{750\text{ nm}}$ de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose 5 μl de cada una. **(F)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en agitación y condiciones de fotoheterotrofia. **(G)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en agitación y condiciones de mixotrofia. **(H)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en agitación y condiciones de fotoautotrofia. **(I)** Cantidad de clorofila normalizada por el crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en agitación y condiciones de fotoautotrofia (BG11c), mixotrofia (G) y fotoheterotrofia (G+D) **(J)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre) y ΔF en diferentes regímenes de luz: luz continua, día largo (16 horas de luz) o día corto (8 horas de luz). El experimento se realizó como el apartado E En este caso las estirpes se cultivaron en un fitotrón con una luz de crecimiento fue de $60\ \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las placas de día corto se cultivaron durante 11 días mientras que las placas de día largo y luz continua solo 7 días. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

En una primera aproximación se determinó el crecimiento de cada estirpe en las diferentes condiciones. Por tanto, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos en medio sólido y fotoautotrofia, mixotrofia o fotoheterotrofia (Figura 40E). Del mismo modo, se analizaron más detalladamente sus características en medio líquido y las diferentes condiciones mediante el estudio de su crecimiento y la acumulación de clorofila. Ya que la estirpe $\Delta F/S$ era sensible a luz los experimentos se realizaron a baja luz ($5\ \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). De esta forma se ratificó que dicha estirpe era incapaz de crecer fotoautotróficamente (Figura 40E, 40H), posiblemente debido a que sin una actividad SBPasa la cianobacteria es incapaz de fijar carbono fotosintéticamente. Además, esta estirpe en condiciones de mixotrofia y fotoheterotrofia alcanzó un mayor crecimiento que el resto de las estirpes a los tiempos estudiados (Figura 40E, 40F, 40G). Puesto que las rutas del catabolismo de la glucosa y la fijación de carbono comparten intermediarios esta mejora del crecimiento podría deberse a una menor toma de estos intermediarios desde las rutas catabólicas hacia la fijación (Makowka et al., 2020). Sin embargo, pese a que la estirpe ΔF resultó indistinguible de la estirpe silvestre tanto en fotoautotrofia como en mixotrofia o fotoheterotrofia, se determinó que cuando dicha estirpe crecía en ciclos de luz/oscuridad presentaba una disminución en el crecimiento respecto a la estirpe silvestre (Figura 40J). Este efecto se potenciaba en ciclos de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) respecto a ciclos de día largo (16 horas de luz), lo que apoyaba que la enzima tuviera un papel en la ruta de las pentosas fosfato durante la oscuridad.

1.2.2. Determinación del consumo de carbono.

Ya que tanto la actividad FBPasa como la actividad SBPasa son importantes para los ciclos del carbono en organismos fotosintéticos, se analizó la capacidad de acumular carbono en forma de glucógeno o tomar la glucosa del medio de las

estirpes mutantes $\Delta F/S$ y ΔF respecto a la estirpe silvestre. Como la estirpe $\Delta F/S$ es incapaz de crecer sin un aporte exógeno de carbono, se determinó el consumo de glucosa del medio en mixotrofia y, debido a la sensibilidad a la luz de esta estirpe, estos experimentos se realizaron a baja luz ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A esta intensidad de luz la actividad metabólica a través de las pentosas fosfato debe estar activa para la metabolización de la glucosa (Nakajima et al., 2014).

Para estudiar la metabolización del carbono se determinó la cantidad de glucosa extracelular que quedaba en el medio en las distintas estirpes tras inocularlas en medio fresco que contenía glucosa 10 mM; estos cultivos fueron burbujeados con aire que contenía CO_2 (1% vol/vol) (Figura 41B). Para cuantificar la glucosa se tomaron muestras de sobrenadante de los cultivos a la vez que se determinaba el crecimiento de los cultivos. Tanto en agitación como en esta condición, donde las estirpes contaban con un suplemento de CO_2 , la estirpe silvestre y la estirpe ΔF crecieron a la misma tasa y más lentamente que la estirpe $\Delta F/S$ en mixotrofia (Figuras 40G, 41A). Se determinó que las estirpes silvestre y ΔF casi no empleaban esta glucosa añadida para crecer, ya que la cantidad de glucosa en el medio durante los primeros dos días varió muy levemente. Sin embargo, estas estirpes sí que presentaron un aumento en su crecimiento al emplear el CO_2 del aire. En el caso del mutante $\Delta F/S$, este utilizó la glucosa extracelular para crecer puesto que esta disminuyó progresivamente conforme aumentaba el crecimiento del cultivo (Figura 41A, 41B). Tras 96 horas de crecimiento mixotrófico esta estirpe solo presentaba el 4% de la glucosa inicial mientras que las otras estirpes aun contaban con más del 45% de la glucosa inicial en el medio. De hecho, tras solo 24 horas de cultivo, las estirpes ΔF y silvestre habían consumido menos del 10% de glucosa extracelular mientras que en el caso del mutante $\Delta F/S$ ya se había consumido casi el 40% de la glucosa.

Por otro lado, se determinó la cantidad de glucógeno en estas estirpes tanto en condiciones de mixotrofia como en fotoautotrofia (Figuras 41C, 41E). En este caso hay que señalar que la estirpe $\Delta F/S$ no sobrevive tras 72 horas sin glucosa, de forma que fue imposible determinar la cantidad de glucógeno en fotoautotrofia a las 72 horas (Figura 41D). Tanto en mixotrofia como fotoautotrofia, durante las primeras horas, el mutante ΔF presentaba una menor disminución en los niveles de glucógeno por lo que probablemente lo consumía más lentamente. Así, tras 24 horas creciendo en condiciones fotoautotróficas los niveles de glucógeno fueron un 20% mayor que los de la estirpe silvestre (Figura 41E), mientras que en mixotrofia fueron un 11% mayor (Figura 41C). Los niveles de glucógeno del mutante $\Delta F/S$ en fotoautotrofia (Figura 41E) no presentaron cambios tras las primeras 24 horas en dicha condición, mientras que las estirpes ΔF y silvestre sí presentaron una leve disminución paulatina de glucógeno. Sin embargo, en condiciones mixotróficas la estirpe $\Delta F/S$ sí que movilizó este glucógeno de una forma similar a la observada en las otras estirpes analizadas (Figura 41C). Por tanto, la mayor cantidad de glucosa que interiorizó la estirpe $\Delta F/S$ con respecto a las estirpes silvestre y ΔF no se acumuló en forma de glucógeno, sino que se empleó para su crecimiento. Posiblemente la toma de glucosa del medio fue preferente para la estirpe $\Delta F/S$ respecto al consumo de glucógeno propio.

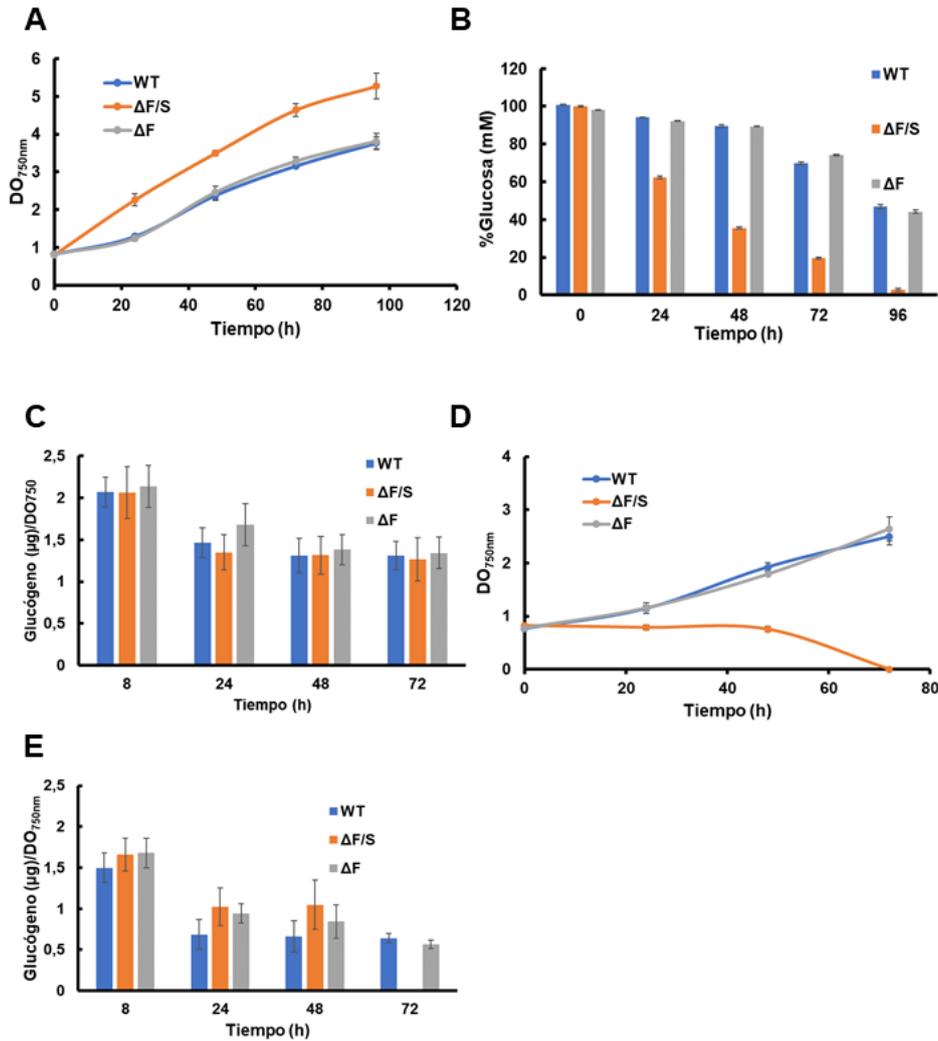


Figura 41. Consumo de glucosa extracelular y glucógeno de las estirpes WT ΔF y $\Delta F/S$ en mixotrofia y fotoautotrofia. (A) Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en medio mixotrofia. **(B)** Consumo de glucosa en las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF cultivadas en condiciones de mixotrofia. El 100% es la medida de glucosa obtenida de BG11c+10mM de glucosa añadida. **(C)** Niveles de glucógeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF cultivadas en condiciones de mixotrofia. **(D)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF en fotoautotrofia. **(E)** Niveles de glucógeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF cultivadas en condiciones de fotoautotrofia. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los experimentos se realizaron a baja luz $5 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y los cultivos fueron burbujeados con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 .

1.2.3 Determinación de las tasas fotosintética y respiratorio de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF .

Puesto que la estirpe $\Delta F/S$ presenta grandes diferencias respecto a la estirpe silvestre en crecimiento y metabolización de carbono dependiendo de las condiciones tróficas, se estudió la capacidad respiratoria y fotosintética de las diferentes estirpes. Además, puesto que la estirpe ΔF presentaba ligeras diferencias en cuanto a la degradación de glucógeno podría presentar variaciones en la tasa respiratoria. Ya que ambas actividades enzimáticas están implicadas en el ciclo de

CBB es esperable esté afectado y se acumule algún metabolito por variaciones en una o ambas actividades.

Para determinar la capacidad fotosintética de las distintas estirpes se realizó el mismo experimento que el descrito en el punto 1.2.2., por lo que las estirpes crecieron en mixotrofia como un pre-cultivo y este se lavó para finalmente crecer en fotoautotrofia o mixotrofia. De estos cultivos se realizaron curvas de saturación a intensidades luminosas crecientes con un electrodo de Clark en ambas condiciones a las 24 y 48 horas de crecimiento (Figura 41A). Ya que estos cultivos estaban creciendo en condiciones de baja intensidad luminosa ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Figura 21), la estirpe silvestre saturaba antes que en experimentos anteriores donde la luz de crecimiento era de $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 35D), pues contaban con una maquinaria de captación de energía adaptada a baja luz. Tras 24 horas de crecimiento mixotrófico todas las estirpes saturaban a la misma intensidad luminosa ($500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), siendo ligeramente menor la ratio de evolución de oxígeno del mutante $\Delta\text{F/S}$ ($5,5 \pm 1,2 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$) que la de las estirpes ΔF y silvestre ($6,7 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $7,5 \pm 1,7 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$, respectivamente) (Figura 42A). A pesar de esto, el crecimiento de la estirpe $\Delta\text{F/S}$ era mayor (Figura 41A), por lo que este aumento en el crecimiento no guardaba relación con una mayor capacidad fotosintética. Puesto que al carecer de la actividad SBPasa no debería ser capaz de fijar carbono, el aumento en el crecimiento de esta estirpe estaría fundamentado en una mayor eficiencia en el consumo de glucosa (Figura 41B). Tras 48 horas de crecimiento en estas condiciones, la intensidad luminosa a la que saturaban las tres estirpes se mantuvo constante mientras que la estirpe silvestre presentó una mayor ratio de evolución de oxígeno ($12,2 \pm 3,7 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$) que 24 horas antes, siendo a su vez ligeramente superior al de las estirpes ΔF y $\Delta\text{F/S}$ ($10 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $8,5 \pm 1,5 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$, respectivamente) (Figura 42B).

Respecto al desprendimiento de oxígeno durante el crecimiento fotoautotrófico las estirpes silvestre y ΔF presentaban ratios similares de evolución de oxígeno ($11,4 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $11,4 \pm 1,3 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ respectivamente tras 24 horas de crecimiento fotoautotrófico y $13,2 \pm 2,4 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $13,5 \pm 0,9 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ respectivamente tras 48 horas) y saturaron a la misma intensidad de luz que en mixotrofia, $500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 42C, 42D). Ya que estas estirpes presentaban un crecimiento casi idéntico tanto en baja luz (Figura 41A) como en alta luz (Figura 59A, 59B) era esperable que tuvieran la misma capacidad fotosintética en fotoautotrofia. En esta condición trófica el mutante $\Delta\text{F/S}$ presentó grandes diferencias con respecto a las otras estirpes, pues saturó a $245 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la ratio de evolución de oxígeno era un 80% menor a la de las otras dos estirpes tras 24 horas de crecimiento sin glucosa en el medio (Figura 42C). A las 48 horas de crecimiento en esta condición el mutante $\Delta\text{F/S}$ no presentó producción de oxígeno, por lo que el transporte electrónico fotosintético no ocurría en este organismo o la tasa del mismo era menor a la tasa respiratoria.

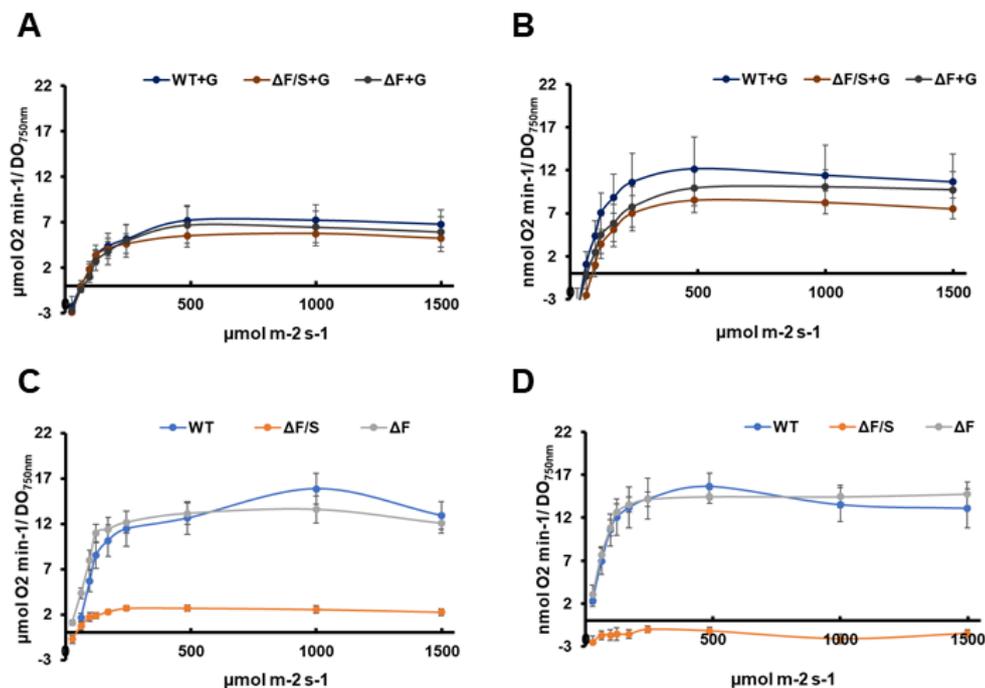


Figura 42. Desprendimiento de oxígeno ante diferentes condiciones de disponibilidad de carbono de las estirpes $\Delta\text{F/S}$ y ΔF . (A) Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F/S}$ y ΔF medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes tras 24 horas de crecimiento en mixotrofia. (B) Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F/S}$ y ΔF medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes tras 48 horas de crecimiento en mixotrofia. (C) Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F/S}$ y ΔF medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes tras 24 horas de crecimiento en fotoautotrofia. (D) Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F/S}$ y ΔF medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes tras 48 horas de crecimiento en fotoautotrofia. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Todos los cultivos crecieron burbujeados con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 .

Para determinar la tasa respiratoria de los diferentes mutantes en mixotrofia y fotoheterotrofia se realizó el mismo diseño de los experimentos anteriores, pero cultivándolos durante 24 horas en condiciones de mixotrofia o fotoheterotrofia. La respiración se midió con un electrodo de Clark, determinándose el consumo de oxígeno durante 60 minutos de oscuridad. Tanto en mixotrofia como en fotoheterotrofia las estirpes ΔF y silvestre presentaron una respiración y, por tanto, probablemente un consumo de glucosa similar (Figura 42). Este consumo de oxígeno medido era superior en condiciones de fotoheterotrofia ($2,24 \pm 0,8$ y $2,4 \pm 0,8$ $\mu\text{mol min}^{-1} / \text{DO}_{750\text{nm}}$ en mixotrofia y $3,26 \pm 0,3$ y $3,6 \pm 0,6$ $\mu\text{mol min}^{-1} / \text{DO}_{750\text{nm}}$ en fotoheterotrofia para ΔF y la estirpe silvestre respectivamente). Puesto que al añadir DCMU (para simular fotoheterotrofia) *Synechocystis* solo puede realizar el flujo cíclico de electrones y no el lineal (donde se libera oxígeno) es esperable que el consumo de oxígeno total sea mayor. En el caso de la estirpe silvestre este consumo ligeramente superior, coincidía con el consumo de glucógeno ligeramente superior también (Figura 41C). En mixotrofia y fotoheterotrofia el consumo de oxígeno para el mutante $\Delta\text{F/S}$ fue de $4,2 \pm 0,3$ y $6,4 \pm 0,6$ $\mu\text{mol min}^{-1} / \text{DO}_{750\text{nm}}$ respectivamente, siendo mayor en fotoheterotrofia y superior al experimentado por las otras estirpes. Ya que esta estirpe en mixotrofia tenía una cantidad de glucógeno similar al resto de estirpes el mayor aumento de la tasa respiratorio correlacionaba con un mayor

consumo de glucosa extracelular (Figura 41B). El que todas las estirpes presentaran un mayor consumo de oxígeno al añadir DCMU señala que probablemente habría diferencias respecto a la actividad de las oxidasas terminales.

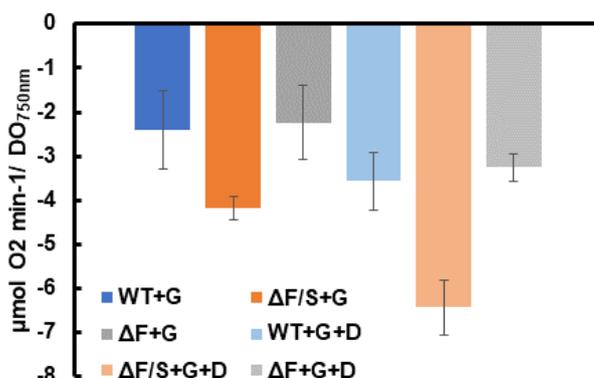


Figura 43. Consumo de oxígeno de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF e mixotrofia y fotoheterotrofia. Consumo de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF medida con un electrodo de Clark tras estar los cultivos 60 minutos de oscuridad. Estos cultivos se encontraban en fase exponencial ($DO_{750}=0,5-1$) creciendo en mixotrofia o fotoheterotrofia burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

2. Análisis de la regulación redox de la FBP/SBPasa y la FBPasa.

Estudios anteriores realizados *in vitro* en estas dos enzimas determinaron que ambas sufrían una regulación inversa, así la enzima FBP/SBPasa es activa reducida y su actividad disminuye al oxidarse (García-Cañas, 2015) mientras que la enzima FBPasa es activa en su forma oxidada y su actividad disminuye al reducirse (Gómez Romero, 2015). Sin embargo, aunque las cisteínas implicadas en el puente disulfuro que activaría a la enzima FBPasa ya se determinaron (Gómez Romero, 2015), en el caso de la FBP/SBPasa las cisteínas implicadas en el puente disulfuro que inactivarían a la enzima no se conocían con precisión (Feng et al., 2013; Cotton et al., 2015). Esta dificultad para discernir las cisteínas implicadas se basa en que la enzima FBP/SBPasa presenta 9 cisteínas, mientras que la enzima FBPasa solo 3. De la misma forma, la regulación *in vivo* ante diferentes condiciones de crecimiento, para ambas enzimas, era desconocida.

Para profundizar en si realmente esta regulación redox ocurría *in vivo* y, por tanto, era posible que ambas FBPasas estén implicadas de forma diferencial en la fijación de CO_2 o en la ruta OPP, se analizó la actividad *in situ* (Figura 44). De forma que, empleando las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF se buscaba conocer en qué condiciones redox estas enzimas serían funcionales, como FBPasas, en el interior celular. Con el fin de determinar la cantidad de magnesio necesaria para este ensayo, ya que es un cofactor esencial, la actividad se midió a diferentes concentraciones del mismo (15, 30, 75 y 150 mM) y se estableció que, en el caso de estas enzimas cianobacterianas, 75 mM era la cantidad adecuada para obtener la máxima actividad posible. La necesidad de una cantidad tan elevada de magnesio probablemente se deba a que, al realizar el ensayo con un organismo con una cantidad de clorofila elevada, esta clorofila actúe quelando magnesio de forma parcial. Por tanto, la cantidad efectiva

del mismo sería menor. El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones establecidas en la sección 5.1.2. de Materiales y Métodos. Puesto que la enzima FBP/SBPasa era fácilmente oxidable por aire no pudo descartarse que al realizar este ensayo la enzima se oxidara de forma parcial artificialmente.

Como se puede observar en la figura 44 la actividad FBPasa de la estirpe $\Delta F/S$ disminuyó en condiciones reductoras (Figura 44A) mientras que la de la estirpe ΔF disminuyó en condiciones no reductoras (Figura 44B). Sin embargo, tanto en condiciones no reductoras para la estirpe $\Delta F/S$ como en condiciones reductoras para la estirpe ΔF la actividad fue muy similar a la de la estirpe silvestre, presentando ligeras variaciones a la menor concentración de magnesio estudiada. Ya que la actividad FBPasa obtenida en el mutante $\Delta F/S$ correspondería a la de la enzima FBPasa los resultados coincidieron con que esta enzima principalmente sería funcional en condiciones no reductoras (Figura 41B), mientras que en condiciones reductoras esta estirpe presentó menos de un 20% de la actividad de la estirpe silvestre. Esto apoya los estudios *in vitro* sobre la regulación de esta enzima, que sería activa oxidada y su actividad disminuiría en condiciones reductoras (Gómez Romero, 2015). En la estirpe ΔF la actividad fructosa-1 6-bisfosfatasa sería exclusivamente debida a la enzima FBP/SBPasa. En este caso en condiciones reductoras la actividad era muy similar a la de la estirpe silvestre (Figura 44A) lo que coincidía con el hecho de que la FBP/SBPasa al reducirse pase a un estado activo (García-Cañas, 2015). De igual forma en condiciones no reductoras la actividad fue menor a la mitad de la actividad total de la estirpe silvestre.

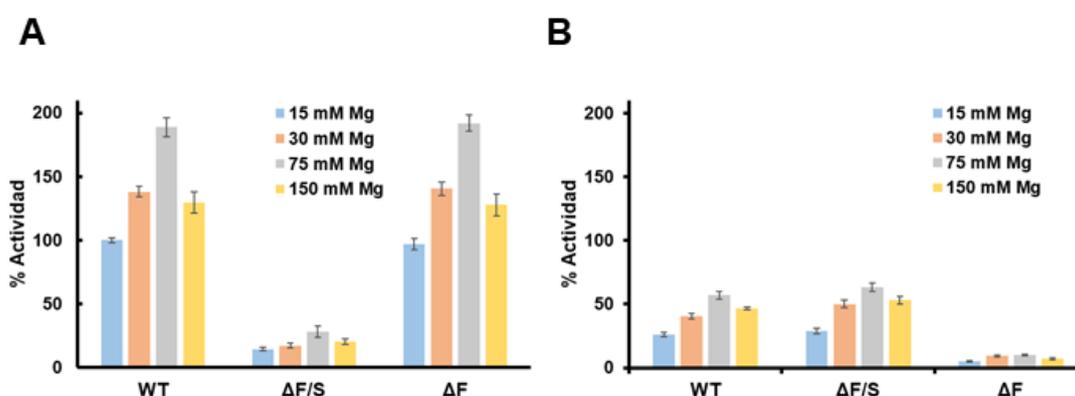


Figura 44. Medida in situ de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa. (A) Medida de actividad FBPasa *in situ* tras la adición de 10 mM de DTT de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$ y ΔF con distintas concentraciones de magnesio en el ensayo. **(B)** Medida igual al apartado A pero sin DTT añadido. Los resultados provienen de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Las muestras se tomaron de células cultivadas en mixotrofia, baja luz ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2

Estos resultados sugieren que, en *Synechocystis*, la enzima FBP/SBPasa actúa en condiciones reductoras (fotosíntesis activa), mientras que la FBPasa actuaría en condiciones no reductoras, que coincidirían con periodos de oscuridad.

2.1. Regulación *in vitro* en la actividad FBPasa por tioredoxina en *Synechocystis*.

Para los ensayos de regulación por oxidación-reducción de las enzimas FBPasa y FBP/SBPasa realizados con anterioridad se habían empleado, de forma general, oxidantes artificiales como DTNB o Cu (Feng et al., 2013; García-Cañas, 2015; Gómez Romero, 2015). Con el fin de determinar si estos oxidantes podían generar cambios irreversibles por sobreoxidación en las enzimas se realizó un estudio de la reactivación de las mismas tras el tratamiento con estos compuestos (Figura 45A). Se midió la actividad de la enzima recombinante FBP/SBPasa que, tras su purificación, fue oxidada con 50 μ M de Cl_2Cu o con el O_2 atmosférico mediante su agitación durante la noche. Tanto la enzima oxidada, por ambos métodos, como la enzima recién purificada se redujeron con 10 mM de DTT, para así determinar si la actividad máxima coincidía tras los diferentes métodos de oxidación o estos habían generado cambios irreversibles. Mientras que con la oxidación mediada por cobre producía una inactivación total, la oxidación por aire reducía la actividad a un 5 % de la actividad máxima (Figura 45A). Sin embargo, la reactivación por reducción con DTT tras uno y otro tratamiento presentó grandes diferencias; la proteína oxidada con cobre alcanzó un 40 % de su actividad máxima tras reducirse con DTT, mientras que la proteína oxidada con aire alcanzó más de un 80% de su máxima actividad al reducirse. De forma que la oxidación con cobre debía haber generado cambios irreversibles en la enzima. Basándonos en estos resultados se escogió la oxidación en aire como el mejor método de oxidación de las enzimas. En el caso de la FBPasa, al ser activa oxidada, la oxidación con cobre y aire aumentó la actividad de la enzima y posteriormente pudo ser reducida con DTT hasta una actividad similar a la observada en la proteína que no había sido oxidada (Figura 45C). De forma que en esta enzima no se produciría un cambio irreversible en la misma al oxidarla con cobre.

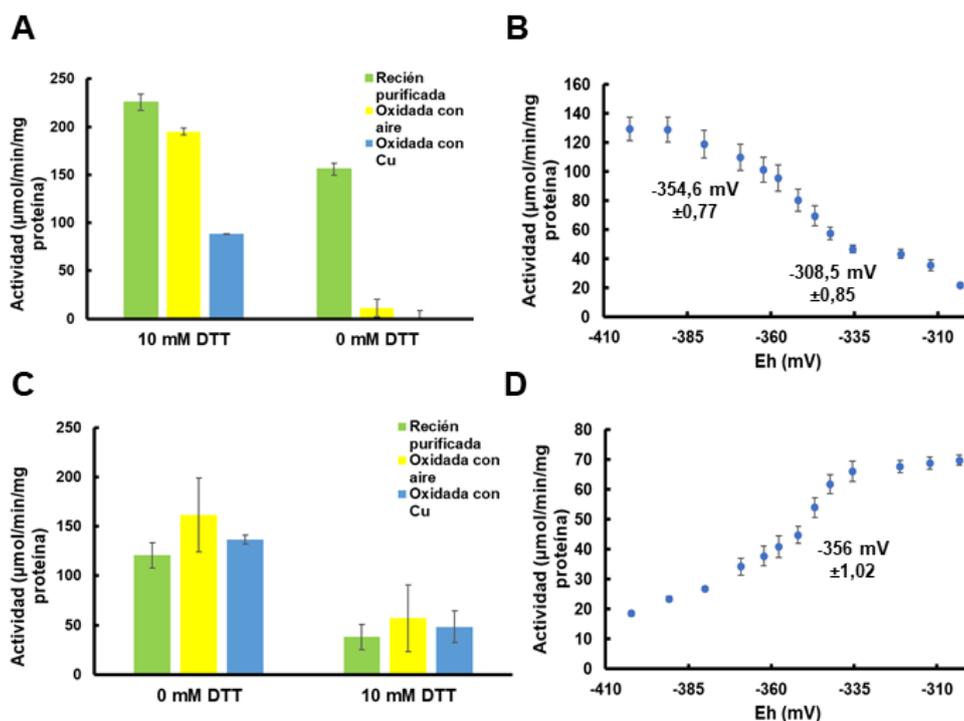


Figura 45. Regulación redox *in vitro* de la actividad de la FBP/SBPasa y FBPasa de *Synechocystis*. (A) Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de la enzima FBP/SBPasa recién purificada, oxidada durante 15 horas con aire mediante su agitación u oxidada con 50 μ M

de Cl_2Cu . Para comprobar la actividad totalmente reducida tras los tratamientos las preparaciones se trataron con 10 mM de DTT. **(B)** Valoración redox de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de la FBP/SBPasa que previamente había sido oxidada con aire durante 15 horas. La actividad se analizó tras 30 minutos de incubación a los E_h indicados obtenidos mediante la adición de 20 mM de DTT en diferentes proporciones de ditiol/disulfuro. Tras esto se añadió el sustrato. El potencial redox del punto medio se calculó empleando el programa informático Prism5. **(C)** Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de la enzima FBPasa recién purificada, oxidada durante 15 horas con aire mediante su agitación u oxidada con 50 μM de Cl_2Cu . Para comprobar la actividad totalmente reducida tras los tratamientos las preparaciones se trataron con 10 mM de DTT. **(D)** Valoración redox de la enzima FBPasa realizada como en el apartado B. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

Uno de los principales sistemas de regulación redox en los diferentes organismos son las tiorredoxinas. *Synechocystis* presenta 4 tipos de tiorredoxinas: TrxA, TrxB, TrxQ y TrxC (Florencio et al., 2006), aunque recientemente se ha demostrado que TrxC no presenta la actividad tiorredoxina típica, de forma que no parece estar implicada en la regulación redox de proteínas diana (Deschoenmaeker et al., 2018; López-Maury et al., 2018; Mihara et al., 2020). Ya que existía la posibilidad de que al presentar regulación redox estas enzimas estuvieran reguladas por las tiorredoxinas A, B o Q se analizó el potencial redox de las mismas a pH 8. Para esto se emplearon diferentes porcentajes de DTT oxidado y reducido que se incubaron con las enzimas y posteriormente se midió su actividad FBPasa (Figura 45). De forma que se determinó que la FBPasa a pH 8 presenta un punto medio de potencial redox (E_{m8}) de -356 mV (Figura 45D) y que, tal y como indicaban los estudios anteriores (Gómez Romero, 2015), el cambio de un estado activo a un estado inactivo por su reducción se debería a la ruptura de un solo puente disulfuro. Sin embargo, en el caso de la FBP/SBPasa el paso de un estado inactivo a un estado activo, por su reducción, parece deberse a la ruptura de dos puentes disulfuro ya que la valoración redox de esta enzima muestra un doble punto de inflexión (Figura 45B). Por tanto, habría más de un par de cisteínas implicadas. Del mismo modo, se calculó E_{m8} para estos dos puentes y correspondería con un valor de -354,6 y -308,5 mV. En ambos casos, estos valores podrían ser compatibles con una posible reducción de las enzimas debido al efecto de las tiorredoxinas (Mihara et al., 2020). Por tanto, se estudió *in vitro* la posible regulación de ambas FBPasas mediada por las tiorredoxinas TrxA, TrxB y TrxQ (Figura 46).

Tras esto se realizaron ensayos de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa al añadir TrxA, TrxB y TrxQ de ambas enzimas que habían sido oxidadas con aire. Para asegurar la total reducción de la tiorredoxina adicionada esta se incubó 30 minutos con 10 μM de DTT en la mezcla de reacción antes de la adición de la enzima y el sustrato de la reacción, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.1.1. de Materiales y Métodos. La cantidad de DTT añadida fue un compromiso para que no se produjera una fuerte inactivación de la FBPasa, ni una gran activación de la FBP/SBPasa. Se añadió una cantidad de DTT que generaba una inactivación de un 10 % en la FBPasa y una activación menor al 20 % en la FBP/SBPasa. Al estudiar la activación por tiorredoxina de ambas proteínas se determinó que la enzima FBP/SBPasa era capaz de regularse positivamente por las tres tiorredoxinas (Figura 46A), aunque en el caso de TrxB y TrxQ necesitaría de una cantidad elevada de estas tiorredoxinas para llegar a duplicar su actividad (5 μM). Sin embargo, TrxA sí provocaba una activación significativa a bajas concentraciones, observándose una activación de 4 veces con menos de 1 μM . Sin embargo, esta misma concentración

de TrxB y TrxQ no produjo un efecto significativo en la actividad enzimática (Figura 46C, 46D). Con estos datos se calcularon los parámetros cinéticos para la FBP/SBPasa con las distintas tiorredoxinas, determinándose que para TrxA la k_{cat} (constante catalítica) es de 0,37 μM ; para la TrxB de 3,4 μM ; y para la TrxQ de 4,5 μM . Por tanto, se determinó que la afinidad por la tiorredoxina A era del orden de 10 veces mayor mientras que el de las otras tiorredoxinas era similar entre ellas.

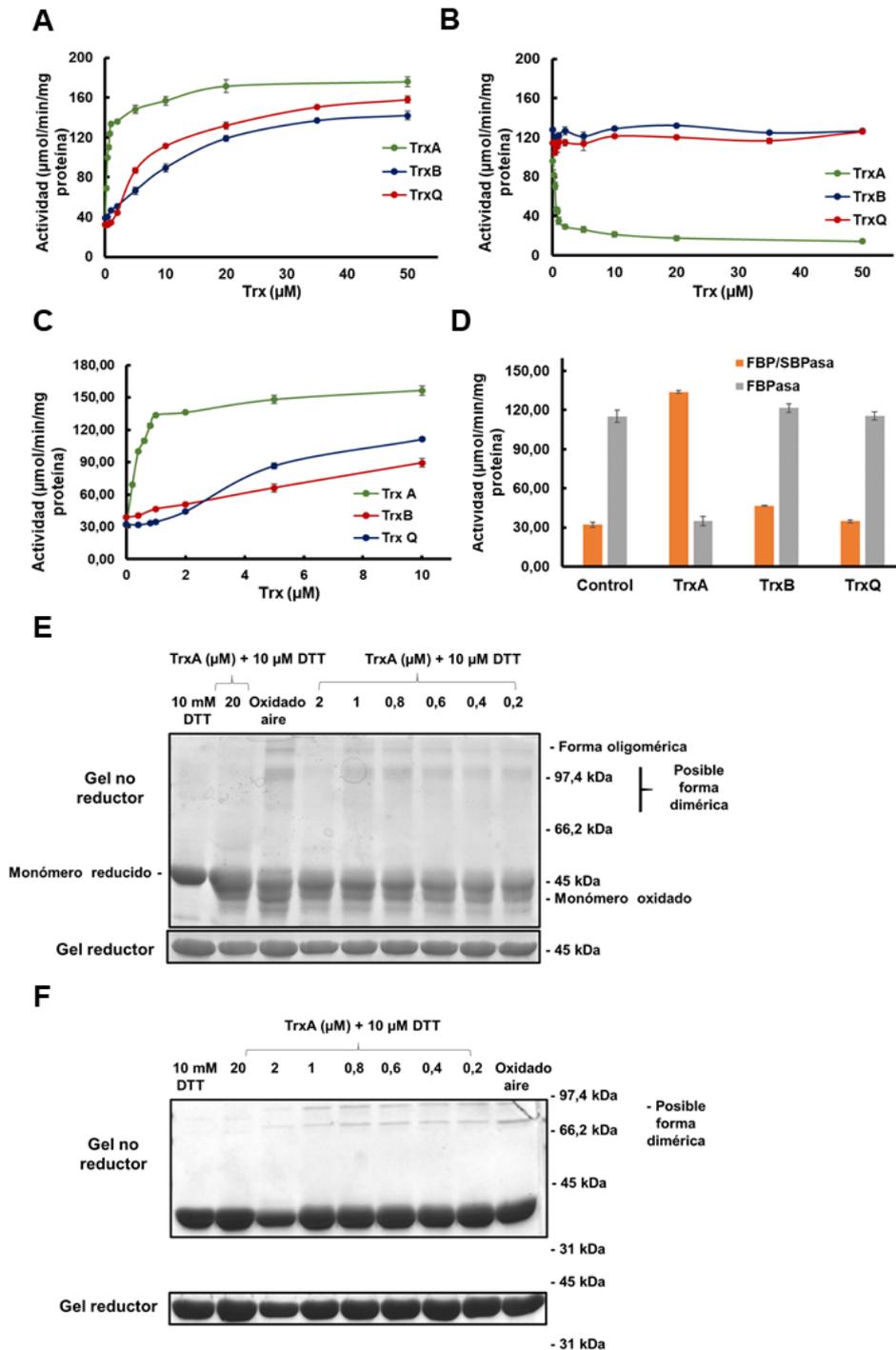


Figura 46. Regulación de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de las enzimas FBP/SBPasa y FBPasa de *Synechocystis* mediada por tiorredoxina. (A) Ensayo de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en preparaciones de la enzima FBP/SBPasa oxidada con aire y tratada con concentraciones crecientes de TrxA, TrxB y TrxQ reducidas con 10 μM de DTT. (B)

Ampliación del apartado A. **(C)** Ensayo de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en preparaciones de la enzima FBPasa realizada como en el apartado A. **(D)** Ensayo de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en preparaciones de las enzimas FBP/SBPasa y FBPasa oxidadas con aire y tratadas con 10 μ M de DTT, 1 μ M de TrxA reducidas con 10 μ M de DTT, 1 μ M de TrxB reducidas con 10 μ M de DTT, 1 μ M de TrxC reducidas con 10 μ M de DTT o sin tratar (control). **(E)** Coomassie de la mezcla de reacción de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa donde la enzima FBP/SBPasa de *Synechocystis* fue previamente oxidada con aire. Se cargaron 5 μ g de proteína FBP/SBPasa con diferentes cantidades de DTT y TrxA y estas se separaron con un gel al 10% en condiciones reductoras y un gel al 7% en condiciones no reductoras mediante electroforesis SDS-PAGE. **(F)** Coomassie de la FBPasa realizado al igual que en el apartado E. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

En el caso de la enzima FBPasa se determinó que solo la adición de TrxA reducida producía una disminución en la actividad de la proteína (Figura 46B, 46D). La adición de TrxB o TrxQ, incluso a concentraciones elevadas de las mismas, no provocó una disminución en la actividad enzimática. En el caso de TrxA, aunque necesita una mayor cantidad que para generar el cambio en la que genera en la enzima bifuncional, con menos de 1 μ M de TrxA la actividad disminuyó 3 veces. De forma que, *in vitro*, una cantidad relativamente pequeña de TrxA es capaz de generar una gran disminución en la actividad. Por lo que ambas enzimas presentaban una regulación contraria, que *in vitro* podía ser realizada por TrxA de manera eficiente (Figura 46D).

Ya que ambas enzimas experimentan cambios en cuanto a su estructura cuaternaria (Feng et al., 2013; Gómez Romero, 2015) dependientes de su estado de oxidación se estudió si estos cambios se observaban también inducidos por la reducción mediada por TrxA. Para esto se realizaron geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras, con cantidades crecientes de TrxA añadida, de ambas proteínas recombinantes que previamente habían sido oxidadas con aire. El gel en condiciones reductoras se empleó como control de carga mientras que el gel en condiciones no reductoras se empleó para determinar si se observaban cambios conformacionales derivados de esta reducción. Para realizarlos se emplearon las mismas mezclas que para la medida de la actividad, por lo que no solo se añadió la enzima y el reductor sino también el tampón a pH básico y el cofactor, de forma que tanto las medidas de actividad como los cambios conformacionales causantes de estos fueran comparables. Cuando la FBP/SBPasa se oxidó con aire se observó la aparición de oligómeros de alto peso molecular, que podrían coincidir con tetrámeros, así como una forma de entre 90-100 kDa que podría coincidir con una forma dimérica de la proteína (Figura 46D). Además, se observó una forma de peso ligeramente inferior al monómero que podría tratarse de este mismo oxidado formando un puente disulfuro intramolecular. Cuando la enzima se trató con DTT 10 mM o TrxA 20 μ M estas formas desaparecieron, quedando solamente el monómero reducido. De forma que al aumentar la cantidad de TrxA añadida las formas diméricas, tetraméricas y el monómero oxidado generaron el monómero reducido. Con este experimento se determinó que TrxA, al igual que una alta concentración de DTT, era capaz de provocar una disminución de las formas oligoméricas oxidadas de la FBP/SBPasa. Sin embargo, a pesar de alcanzarse casi la actividad máxima de la enzima tras añadir 1 μ M de la tiorredoxina, las formas oxidadas no desaparecieron completamente en el gel con dicha concentración (Figura 46E). Esto implica que en la forma tetramérica activa es posible que estén presentes algunos puentes disulfuro entre cisteínas. En el caso de la FBPasa, al oxidarse aparecía una forma cuyo peso

molecular podría coincidir con un dímero de la enzima que desaparecía al reducirse con DTT. Ante cantidades crecientes de tioredoxina este posible dímero también desaparecía (Figura 46F). Por lo que en ambos casos tras la adición de TrxA se observaron cambios conformacionales similares a los generados por DTT (Figura 46, (García-Cañas, 2015)).

2.2. Determinación de las cisteínas implicadas en la regulación de la FBP/SBPasa.

Puesto que las cisteínas implicadas en la regulación redox de la enzima FBPasa ya son conocidas, se procedió a intentar determinar cuáles eran estos residuos en la FBP/SBPasa. En el caso de la FBPasa se ha determinado que son las cisteínas 102 y 119 aquellas capaces de formar un puente disulfuro que provoca la activación de la enzima, por lo que la alteración de una de ellas o ambas provocaba la pérdida de su actividad (Gómez Romero, 2015). Sin embargo, para la enzima FBP/SBPasa las cisteínas que formarían el puente disulfuro que provocaría su inactivación no han sido descritas con precisión. Estudios cristalográficos señalaron la posible existencia de dos estados tetraméricos en la proteína FBP/SBPasa de cianobacteria (Feng et al., 2013), donde el estado tetramérico reducido sería el activo y el oxidado sería inactivo, coincidiendo así con las medidas de actividad realizadas (Figura 45). El estado inactivo, o de baja actividad estaría posibilitado por la formación de un puente disulfuro entre dos cisteínas de la proteína. Varios estudios señalan a los pares de cisteínas C75 y C99, C75 y C84 o C75 y C235 como posibles culpables de la formación de este puente disulfuro, por lo que los diferentes estudios realizados sobre dicho puente disulfuro se contradicen (Feng et al., 2013; Guo et al., 2014; Cotton et al., 2015).

2.2.1. Aproximación bioinformática de las cisteínas esenciales.

Para determinar las posibles cisteínas implicadas en la regulación redox de la actividad de la enzima FBP/SBPasa se procedió a analizar la conservación de estos residuos en las cianobacterias tomando la secuencia de 315 proteínas FBP/SBPasa cianobacterianas. Estas fueron alineadas con MUSCLE y, posteriormente, se estudió el grado de conservación de cada aminoácido empleando WebLogo3 (Figura 47A). De este modo se determinó que, de las 9 cisteínas de la proteína, los principales residuos de cisteína conservados en las diferentes cianobacterias son las cisteínas 75, 84 y 99. A pesar de los estudios que señalaban a la cisteína 235 como uno de los posibles residuos implicados en la regulación redox esta mostraba un grado de conservación muy bajo (Guo et al., 2014).

Esta aproximación bioinformática coincide con aquellos estudios que marcaban a C75, C84 o C99 como posibles residuos involucrados en el puente disulfuro inactivador (Feng et al., 2013; Cotton et al., 2015), esto se ve apoyado porque en la estructura cristalográfica de la FBP/SBPasa de *Synechocystis* de la PDB (3RPL) estos tres residuos están cercanos entre sí (Figura 47B). Además, los residuos C75 y C84 de uno y otro monómero son cercanos, algo ya descrito por (Cotton et al., 2015). Por tanto, se procedió a generar versiones mutantes de esta proteína con dichos residuos alterados.

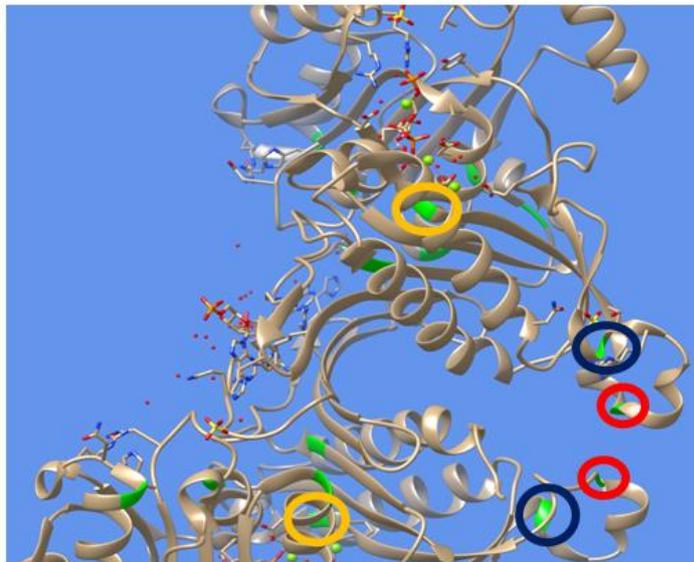
A**B**

Figura 47. Análisis bioinformático de la conservación de cisteínas en la FBP/SBPasa. (A) Determinación de la conservación de los residuos de cisteína en la proteína FBP/SBPasa analizando 315 secuencias cianobacterianas. Las posiciones donde se encuentran cisteínas en la proteína FBP/SBPasa de *Synechocystis* se resaltan en rojo. Las secuencias se alinearon con MUSCLE y la conservación de los residuos se determinó con WebLogo3. **(B)** Representación con CHIMERA de la estructura de la FBP/SBPasa (cadenas D y A) obtenida de la PDB mediante el código de acceso 3RPL. Las cisteínas y los átomos de magnesio aparecen representados en verde. C75 está remarcada con un círculo azul, C84 rojo y C99 amarillo.

2.2.2. Generación y purificación de las proteínas C99S, C77SC84S, C75SC99S y C84SC99S.

Para comprobar la implicación de las cisteínas 75, 84 y 99 en la regulación redox se purificaron proteínas recombinantes donde uno o dos de estas cisteínas fueron sustituidas por serinas, impidiendo por tanto que se establezcan puentes disulfuro.

Puesto que ya se contaba con los plásmidos de expresión para las proteínas recombinantes C75S y C84S (García-Cañas, 2016) se crearon los necesarios para obtener las proteínas C99S, C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S de acuerdo con lo descrito en la sección 2.1.2. de Materiales y Métodos. Las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* BL21 y se purificaron tal y como se describe en la Tabla 12. De forma que todas las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad (Figura 48A) y en el caso de la proteína C84SC99S gran parte de la misma resulto ser insoluble.

2.2.3. Regulación redox de la actividad FBPasa de los mutantes C75S, C84S, C99S, C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S.

Para determinar si las cisteínas 75, 84 o 99 estaban implicadas en el puente disulfuro inactivador se analizó la respuesta de las variantes que carecían de uno o dos de estos residuos a reducción y oxidación. Tras su completa purificación las enzimas fueron oxidadas con aire mediante agitación durante 15 horas. Puesto que al oxidarse sería la formación de este puente disulfuro quien posibilitaría la estructura inactiva si no pudiera formarse el mismo la actividad de la enzima no decaería. Inicialmente se estudió la actividad FBPasa de las proteínas silvestre, C75S, C84S y C99S tras ser oxidadas y posteriormente reactivadas con DTT como agente reductor (Figura 48). Como anteriormente se mostró para la proteína silvestre recombinante, la oxidación con cobre incapacitaba la completa recuperación de su actividad al reducirse mientras que la oxidación con aire no (Figura 45A, Figura 48). De esta forma, no se produjo la reactivación de las proteínas C75S y C84S tras su oxidación con cobre ya que solo alcanzaron un 5% de la actividad total de la proteína al reactivarse con 10 mM de DTT (Figura 48C, 48D). Por tanto, estas cisteínas podrían cumplir alguna función para evitar la sobreoxidación que inducirían agentes como el cobre. Al ser oxidadas con aire y posteriormente reducidas ambas proteínas mostraron una reactivación similar, aunque la actividad total máxima de la proteína C75S fue ligeramente menor. De forma general, la actividad máxima total de las proteínas C75S y C84S representaron el 74% y 88% de la de la proteína silvestre (Figura 48B, 48C, 48D).

Sin embargo, la mayor diferencia en lo referente a la actividad se observó en la proteína C99S, donde la oxidación con cobre no generó un cambio en la actividad total de la proteína ya que incluso recién purificada necesitaba de una gran cantidad de DTT para presentar actividad (Figura 48E). Independientemente de que hubiera sido o no oxidada la actividad total de la misma fue menor a un 15% de la actividad de la versión silvestre. Ya que la cisteína 99 se encuentra cerca del sitio de coordinación con magnesio (Figura 47B) se estudió si esta baja actividad se debía a una menor afinidad por el cofactor que haría que fuera necesaria una mayor concentración para actuar eficientemente. De forma que se añadió 10 mM de DTT a C99S sometida a los diferentes tratamientos y se midió la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa con diferentes concentraciones de magnesio (Figura 48F). Con esto se determinó que la actividad máxima, independientemente del tratamiento previo, era constante e independiente de la cantidad de magnesio. Por lo que si el cambio en la actividad se debía a una menor afinidad con el magnesio esto no era compensable.

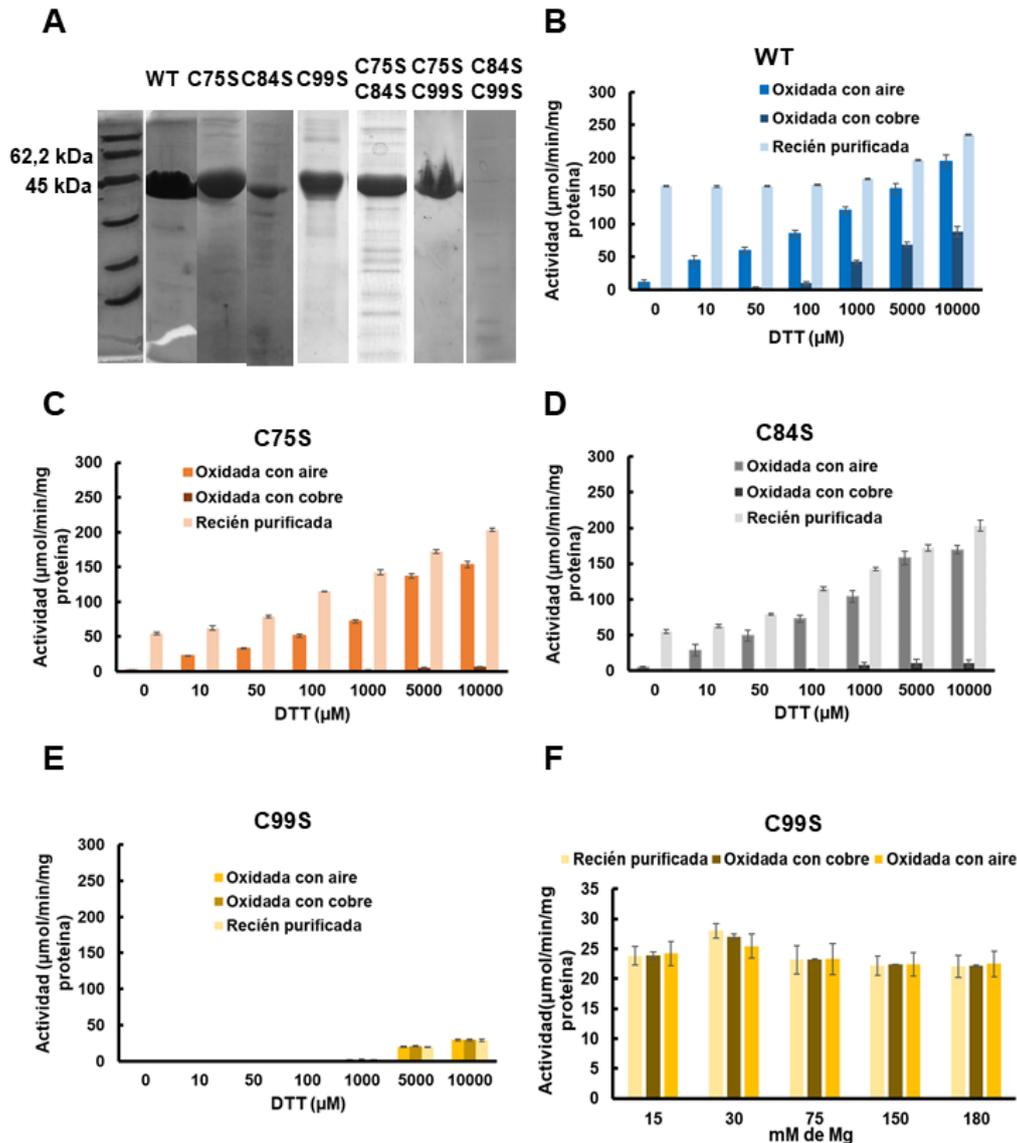


Figura 48. Purificación de las proteínas con las cisteínas 75, 84 y/o 99 alterados a serina y regulación redox de las proteínas FBP/SBPasa C75S, C84S y C99S. (A) Coomassie de la purificación por afinidad con columna de níquel de la enzima FBP/SBPasa de *Synechocystis* recombinante en diferentes versiones. Se cargaron 5 μg de la purificación y estos se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. Cada purificación se realizó 3 veces, como mínimo. (B) Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de la enzima FBP/SBPasa recién purificada, oxidada durante 15 horas con aire u oxidada con 50 μM de Cl₂Cu. Las preparaciones se trataron con concentraciones crecientes de DTT. (C) Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C75S (D) Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C84S (E) Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C99S (F) Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de la enzima FBP/SBPasa C99S recién purificada, oxidada durante 15 horas con aire u oxidada con 50 μM de Cl₂Cu. Las preparaciones se trataron con 10 mM de DTT y concentraciones crecientes de magnesio. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

Puesto que en ninguno de los mutantes simples de las cisteínas se obtuvieron resultados que indujeran a pensar que la eliminación de una de ellas produjo una estructura permanentemente activa, se desestimó que entre estas cisteínas se estableciera solamente un puente intramolecular al oxidarse que mantuviera la

conformación inactiva. Por tanto, se procedió a analizar la actividad en estas condiciones de las enzimas C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S, donde dos cisteínas habían sido alteradas a la vez (Figura 49). De esta forma se determinó que la proteína C75SC84S presentaba una actividad máxima mayor a la de la proteína silvestre, tanto oxidada con aire, cobre o sin haber sido tratada. De forma que la actividad máxima de la proteína silvestre oxidada con aire era de 200 U/mg proteína mientras que la de C75SC84S era de 250 (Figura 49A, 49B). De hecho, presentaba una actividad similar a la de la proteína silvestre tras ser activada con 0,1 mM de DTT. Incluso su actividad máxima al oxidarse con cobre y reactivarse fue del doble de la de la FBP/SBPasa silvestre. Esto señaló que ambos residuos podrían estar implicados en la formación de una conformación inactiva, puesto que las proteínas C75S y C84S presentaron una regulación similar a la de la proteína silvestre (Figuras 48C, 48D, 49E) y solo cuando ambas fueron alteradas se obtuvo una proteína siempre activa (Figura 49B, 49E), podría deberse tanto a un puente intra- como intermolecular donde intervinieran ambas. Por lo que debe ser capaz de establecerse puentes disulfuro C75-C84, C75-C75 y C84-C84 de uno y otro monómero (dado la proximidad entre diferentes monómeros de ambas).

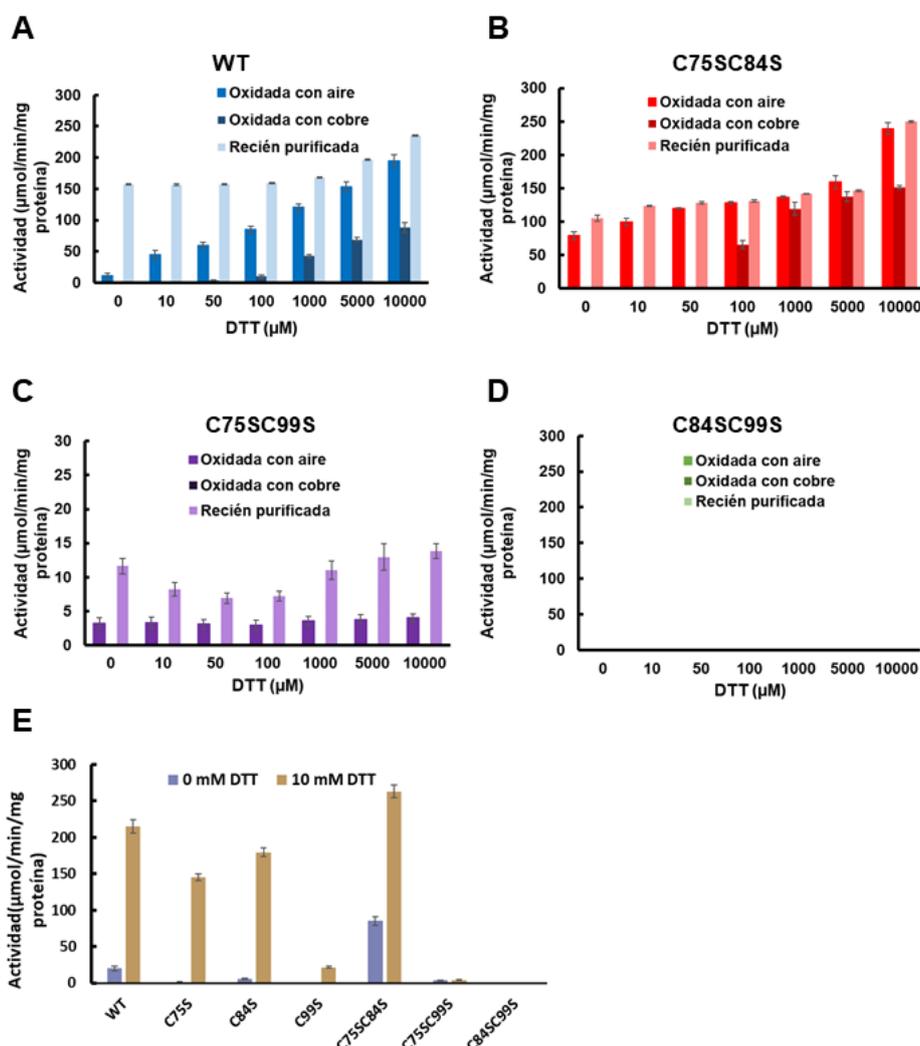


Figura 49. Las proteínas C75SC99S y C84SC99S, a diferencia de C75SC84S, no son susceptibles de regulación redox. (A) Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de la enzima FBP/SBPasa recién purificada, oxidada durante 15 horas con aire u oxidada con 50 µM

de Cl_2Cu . Las preparaciones se trataron con concentraciones crecientes de DTT. **(B)** Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C75SC85S. **(C)** Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C75SC99S. **(D)** Ensayo realizado como en el apartado A de la enzima FBP/SBPasa C84SC99S. **(E)** Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de las enzimas FBP/SBPasa, C75S, C84S, C99S, C75SC84S, C75SC99S o C84SC99S oxidadas durante 15 horas con aire y tratadas, o no, con 10 mM de DTT. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

En el caso de la proteína C75SC99S, al oxidarse con cobre pasó a ser totalmente inactiva (Figura 49C), por lo que su reducción no se tradujo en un aumento en la actividad. Esta proteína presentó una actividad constante tanto recién purificada como oxidada con aire independientemente de la adición o no de un agente reductor, aunque la oxidada con aire presentó una menor actividad. En el caso de la proteína que no había sido oxidada su actividad fue un 6% de la actividad máxima de la enzima silvestre y tras oxidarse con aire esta actividad bajó a un 2% (Figura 49A, 49C, 49E). Por último, la proteína C84SC99S independientemente de la cantidad de agente reductor o de si previamente había sido o no oxidada no presentó actividad FBPasa (Figura 49D, 49E). En todos los casos, la alteración de la cisteína 75 u 84 en combinación con la 99 agravó el efecto de la alteración exclusivamente de la cisteína 99 (Figuras 48 y 49).

2.2.4. Cambios conformacionales de las proteínas C75S, C84S, C99S, C75SC84S, C75SC99S y C84SC99S.

Ya que dependiendo del estado de oxidación la FBP/SBPasa presenta diferentes conformaciones, se analizaron los cambios conformacionales para las diferentes versiones generadas. Para esto se emplearon geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras, al igual que en el apartado 2.1., empleando las mismas mezclas de tampón, enzima, magnesio y reductor que para las medidas de actividad (Figura 50).

En el caso de la proteína silvestre, esta presentaba la forma monomérica oxidada, así como posibles dímeros y oligómeros de alto peso molecular que podrían corresponderse con tetrámeros en estado oxidado (Figura 50A). Estas estructuras también estaban presentes en el caso de las proteínas C75S y C84S, pues ambas presentaban el mismo patrón una con respecto a otra. A diferencia de la proteína silvestre, que presentaba varias formas monoméricas oxidadas, estos dos mutantes presentaron principalmente una sola forma al oxidarse. Además, el patrón de oxidación de las proteínas C75S y C84S presentaba una mayor presencia de estructuras oligoméricas de alto peso molecular (Figura 50B, 50C). La mayor diferencia en cuanto a las proteínas donde solo una cisteína fue modificada, al igual que en el caso de la actividad, se observó en la proteína C99S (Figuras 48D, 50D). En esta, a diferencia de en las anteriores, las formas diméricas y oligoméricas estaban igualmente representadas, aunque el porcentaje de estas respecto a la forma monomérica fue bajo. Además, contaba con una forma monomérica oxidada mayoritaria, En este caso el patrón de oxidación fue totalmente diferente, tras añadir 0,01 mM de DTT ya no se presentaron formas oxidadas de alto peso molecular o monoméricas, pese a que a esa cantidad de reductor no presenta actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa (Figura 48E, 50C).

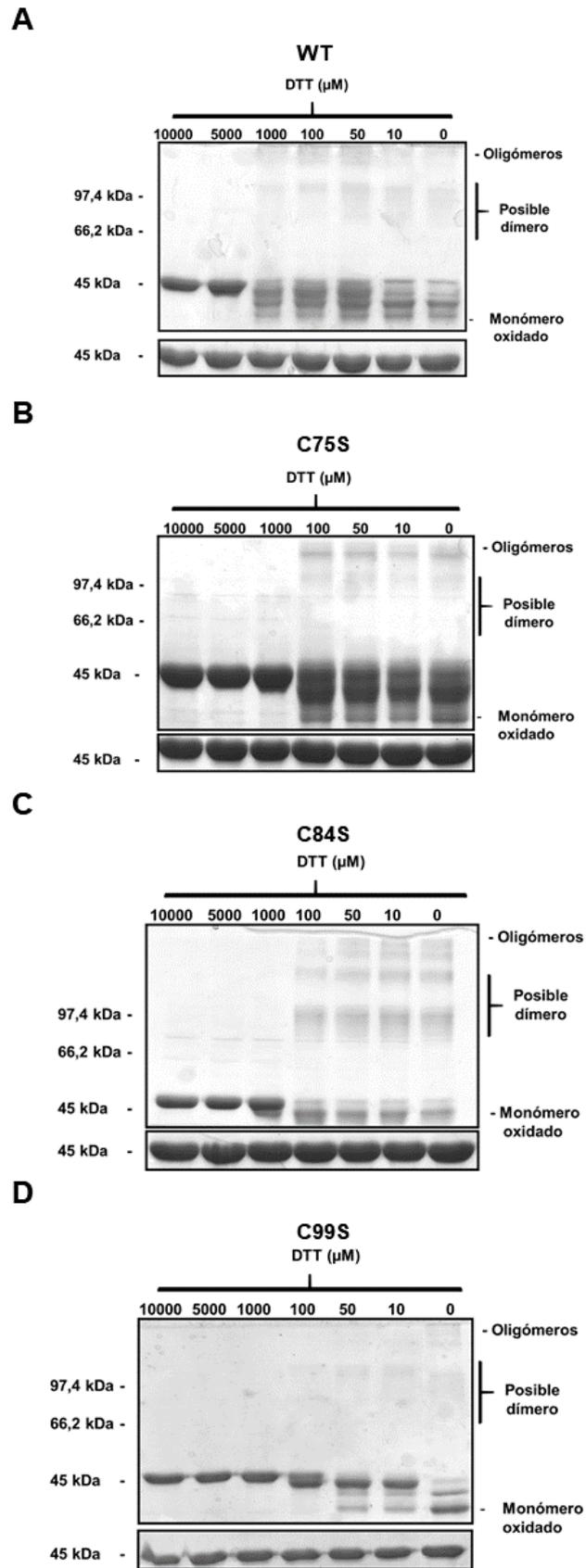


Figura 50. Cambios conformacionales en la proteína FBP/SBPasa y sus variantes con una cisteína alterada ante la oxidación-reducción. (A) Coomassie de la mezcla de reacción de

actividad FBPasa donde la enzima FBP/SBPasa WT (silvestre) de *Synechocystis* fue previamente oxidada con aire. Se cargaron 5 µg de proteína con diferentes cantidades de DTT y estas se separaron con un gel al 10% en condiciones reductoras y un gel al 7% en condiciones no reductoras mediante electroforesis SDS-PAGE. **(B)** Coomassie de la enzima C75S realizado como en el apartado A. **(C)** Coomassie de la enzima C84S realizado como en el apartado A. **(D)** Coomassie de la enzima C99S realizado como en el apartado A. En todos los casos la imagen superior corresponde a condiciones no reductoras y la inferior a condiciones reductoras.

En las proteínas con dos residuos de cisteínas alterados también se observó un patrón diferencial respecto al de las proteínas donde solo un residuo había sido sustituido. La proteína C75SC84S oxidada presentaba un enriquecimiento en formas oligoméricas mientras que la representación de formas diméricas inactivas era escasa (Figura 51A). Además, a diferencia de las formas de alto peso molecular de las proteínas anteriores, en la proteína C75SC84S había una forma principalmente representada que, en base a las medidas de actividad oxidada, probablemente sea activa (Figura 49B, 51A). A diferencia de las proteínas anteriores su patrón de monómero oxidado fue el que presentaba una mayor similitud con la proteína silvestre. La proteína C75SC99S, aquella que siempre presentaba una actividad que era invariable (Figura 49C), fue capaz de adoptar diferentes conformaciones al oxidarse. Fue la proteína donde más se favorecieron las conformaciones diméricas, que a su vez eran diferenciables a las del resto (Figura 51B). Además, el patrón de monómero oxidado de esta fue similar al de la proteína C99S, aunque C75SC99S siempre presentaba un porcentaje de monómero reducido. Ya que al oxidarse con cobre perdía su capacidad catalítica se comparó el patrón adoptado al oxidarse con cobre con respecto al patrón obtenido al oxidarse con aire (Figura 51C). Al oxidarse con cobre hay una disminución las formas diméricas y aumentan las formas oligoméricas respecto a la oxidada con aire. Además, necesitó de una mayor cantidad de DTT para adoptar una conformación totalmente reducida (Figura 51C). En el caso de la proteína C84SC99S, que carecía de capacidad catalítica, se observó que el patrón de oxidación no incluyó estructuras oligoméricas o diméricas mientras que la estructura monomérica oxidada no presentó similitudes con ninguna otra proteína (Figura 51D).

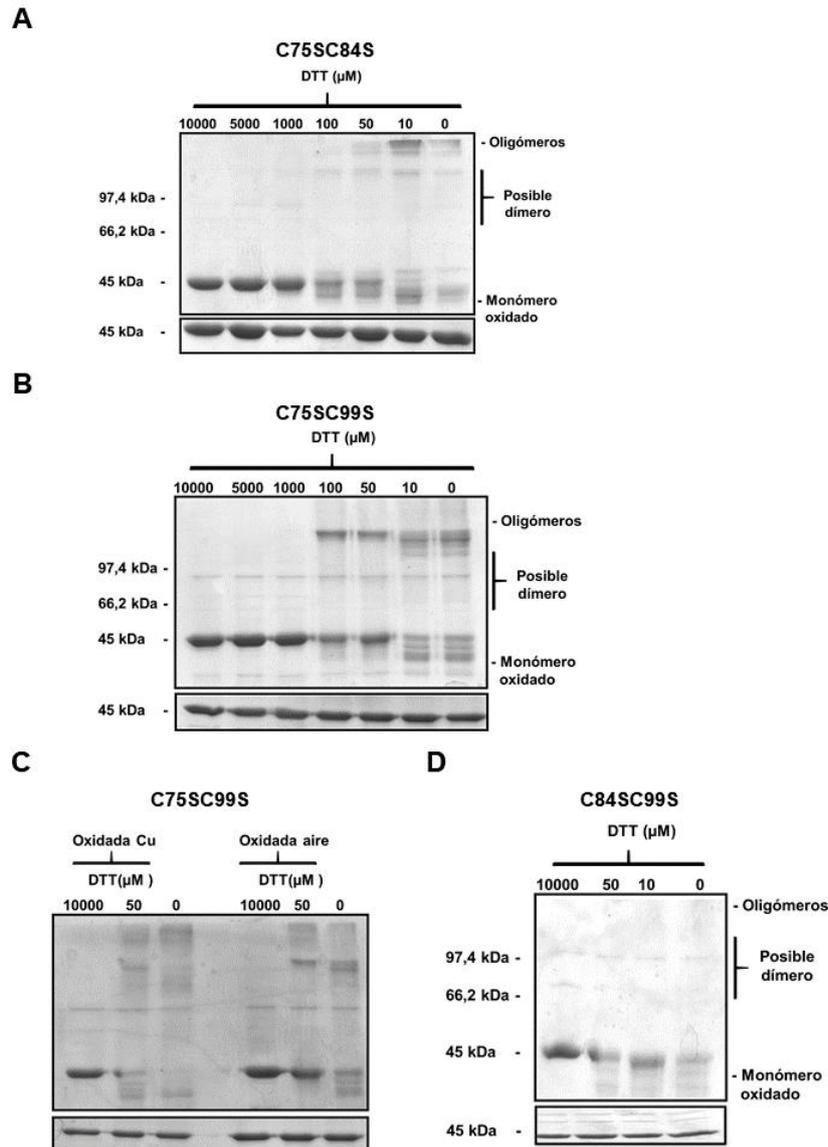


Figura 51. Cambios conformacionales en las proteínas FBP/SBPasa con dos de sus cisteínas alteradas ante la oxidación-reducción. (A) Coomassie de la mezcla de reacción de actividad FBPasa donde la enzima C75SC84S fue previamente oxidada con aire. Se cargaron 5 μg de proteína con diferentes cantidades de DTT y estas se separaron con un gel al 10% en condiciones reductoras y un gel al 7% en condiciones no reductoras mediante electroforesis SDS-PAGE. **(B)** Coomassie de la enzima C75SC99S realizado como en el apartado A. **(C)** Coomassie de la mezcla de reacción de actividad FBPasa donde la enzima C75SC99S fue previamente oxidada con aire o 50 μM de cobre. Se cargaron 4 μg de proteína con diferentes cantidades de DTT y estas se separaron con un gel al 10% en condiciones reductoras y un gel al 7% en condiciones no reductoras mediante electroforesis SDS-PAGE. **(D)** Coomassie de la enzima C84SC99S realizado como en el apartado A. Se cargaron 3,5 μg de enzima. En todos los casos la imagen superior corresponde a condiciones no reductoras y la inferior a condiciones reductoras.

2.2.5. Efectos de la sobreexpresión de las variantes C75SC85S y C99S de la FBP/SBPasa.

Puesto que, *in vitro*, la proteína C75SC84S presentaba actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa independientemente de que esté oxidada o reducida y la proteína C99S

tenía una actividad muy baja, se procedió a estudiar si estas características también se mantendrían *in vivo*. Para esto se generaron estirpes de *Synechocystis* que expresaban de forma constitutiva tanto una como otra proteína además de la proteína silvestre FBP/SBPasa.

2.2.5.1. Generación de las estirpes sobreexpresoras de C75SC85S y C99S en *Synechocystis*.

Para generar la estirpe C75SC84S, que expresaba constitutivamente la proteína FBP/SBPasa con las cisteínas 75 y 84 sustituidas por serinas, y la estirpe C99S, que expresaba la proteína FBP/SBPasa con la cisteína 99 sustituida por serina, se transformó la estirpe silvestre de *Synechocystis* con los plásmidos *glnN_pCpcB+His_slr2094_C75S-C84S* y *glnN_pCpcB+His_slr2094_C99S*, respectivamente. De esta forma el gen que codifica para la FBP/SBPasa alterada en cada estirpe queda bajo el control del promotor constitutivo fuerte de *cpcB* (Zhou et al., 2014), además estas proteínas contaban con una cola de 6 histidinas en su extremo amino y el sitio de unión con el ribosoma (RBS) de *E. coli* (Figura 52A).

Tras la transformación de la estirpe silvestre con las construcciones realizadas, la segregación de ambas estirpes se comprobó mediante PCR (Figura 52B).

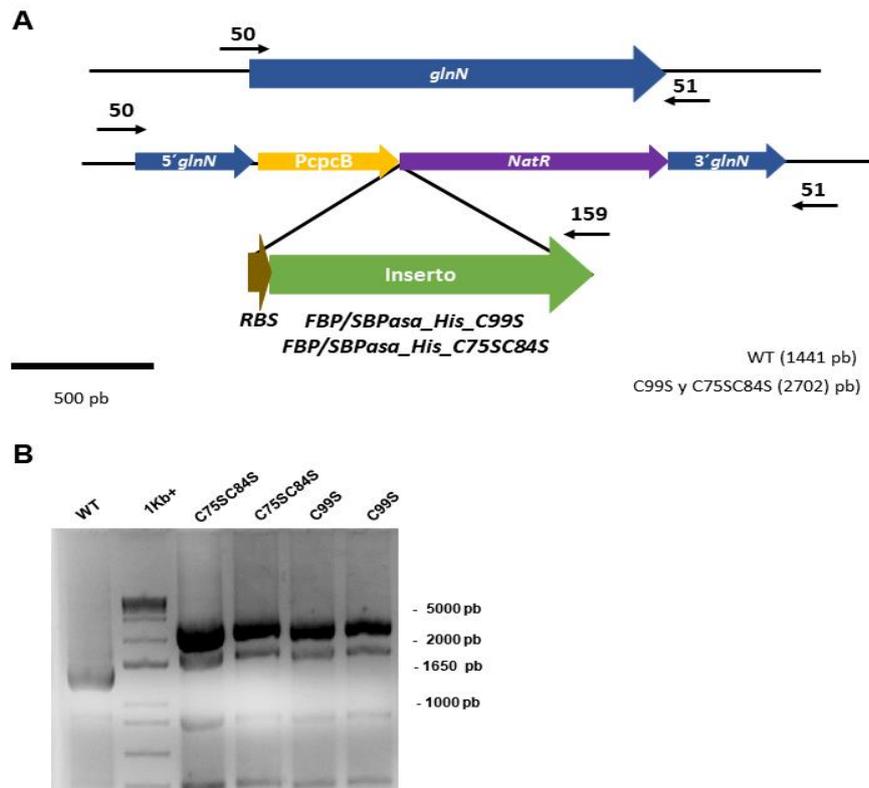


Figura 52. Construcción de las estirpes C99S y C75SC84S de *Synechocystis*. (A) Representación esquemática de la de la región *glnN* en las estirpes WT (silvestre), C99S y C75SC84S. Las versiones alteradas del gen *slr2094*, con la secuencia codificante para una cola de histidinas, se expresaron bajo un promotor constitutivo con un sitio de unión al ribosoma (RBS) de *E. coli* en otra región del genoma de *Synechocystis* (*glnN*). (B) Análisis por PCR de la segregación de las estirpes C75SC84S, C99S y WT (silvestre) usando los oligonucleótidos 159, 50 y 51.

2.2.5.2. Análisis fisiológico de las estirpes C75SC85S y C99S.

Puesto que las construcciones para la generación de las estirpes se realizaron de manera análoga a las de la estirpe S/F (García-Cañas, 2016) (estirpe sobreexpresora de la FBP/SBPasa) se emplearon tanto esta como la estirpe silvestre como controles. Así, se buscó determinar si la sobreexpresión de las variantes de esta enzima suponía una mejora respecto a la sobreexpresión de la enzima silvestre (estirpe S/F) o, por el contrario, eran similares a la estirpe silvestre.

Como una primera aproximación sobre el posible efecto de estas proteínas se estudió el crecimiento de las estirpes C75SC85S, C99S, S/F y silvestre ante diferentes intensidades luminosas (Figura 53A, 53B, 53C). Las cuatro estirpes crecieron a la misma velocidad en condiciones de crecimiento estándar (BG11c con 1% CO₂ y 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 53A). Anteriores estudios habían descrito que la estirpe S/F presentaba una mejora en el crecimiento solo ante mayores intensidades luminosas (García-Cañas, 2016; Liang y Lindblad, 2016), por lo que se cultivaron las cuatro estirpes a distintas intensidades lumínicas para comprobar si en estas condiciones la sobreexpresión de una enzima con baja actividad (C99S) o con alta actividad (C75SC85S) supondría una ventaja respecto a la estirpe S/F. Estas intensidades fueron de 185 y 360 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 53B, 53C). Se determinó que en ambos casos la sobreexpresión de la enzima C99S no suponía una ventaja en el crecimiento, incluso supuso un leve retraso respecto a la estirpe silvestre (Figura 53B, 53C). Por lo que, a pesar de expresar la proteína endógena, el que exprese a su vez una proteína donde esta cisteína ha sido alterada disminuyó la eficiencia de la silvestre. La estirpe C75SC84S, a pesar de que esta enzima presentó una mayor actividad que la proteína silvestre y de que su bajada en la actividad por la oxidación fue menor (Figura 49), presentó una mejora en el crecimiento en alta luz similar al de la estirpe S/F (Figura 53B, 53C). Por lo que el que la estirpe C75SC84S sobreexpresase una enzima FBP/SBPasa más eficiente que la silvestre no supuso una ventaja en la eficiencia. Adicionalmente se determinó la cantidad de clorofila por OD de las diferentes estirpes a las distintas intensidades de luz de crecimiento (Figura 53D). Las diferencias observadas en el crecimiento se mantuvieron para la cantidad de clorofila, siendo mayor la diferencia cuanto mayor fue la luz de crecimiento. En el caso de la estirpe C99S esta medida también fueron levemente inferior a la estirpe silvestre. Para comprobar que realmente se producía una sobreexpresión de la FBP/SBPasa, especialmente en el caso de la estirpe C99S, se analizó la cantidad de proteína mediante Western Blot tras 24 horas en condiciones de crecimiento estándar (Figura 53E). Determinándose así que las estirpes S/F, C75SC84S y C99S presentaban una acumulación mayor de dicha proteína que la estirpe silvestre. Por lo que el fenotipo de la estirpe C99S no se debía a que realmente no sobreexpresara la enzima. Sin embargo, al estudiar si había cambios en el crecimiento debidos a diferentes regímenes de luz (ciclos de luz durante 8h y oscuridad durante 16h o viceversa) no se observó ningún cambio en el crecimiento a luz de crecimiento estándar (Figura 53F). Por lo que no parece haber relación entre esta proteína y la respuesta metabólica en oscuridad.

Puesto que los estudios anteriores señalaron que la estirpe S/F presentaba una mayor acumulación de glucógeno ante alta luz (García-Cañas, 2016) se estudió esto para las estirpes C75SC84S y C99S cultivados a 185 y 360 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

(Figura 53G 53H). En todas las estirpes la acumulación de glucógeno fue mayor cuanto mayor fue la luz de crecimiento, pero las estirpes S/F y C75SC84S fueron las que presentaron una mayor cantidad de glucógeno. Ambas estirpes presentaron una acumulación similar entre ellas. En el caso de la estirpe C99S, al igual que en cuanto al crecimiento, su acumulación de glucógeno fue similar e incluso levemente menor a la de la estirpe silvestre. Por tanto, la sobreexpresión de ambas proteínas no supuso una mejora respecto a la sobreexpresión de la versión de la FBP/SBPasa no alterada (Figura 53).

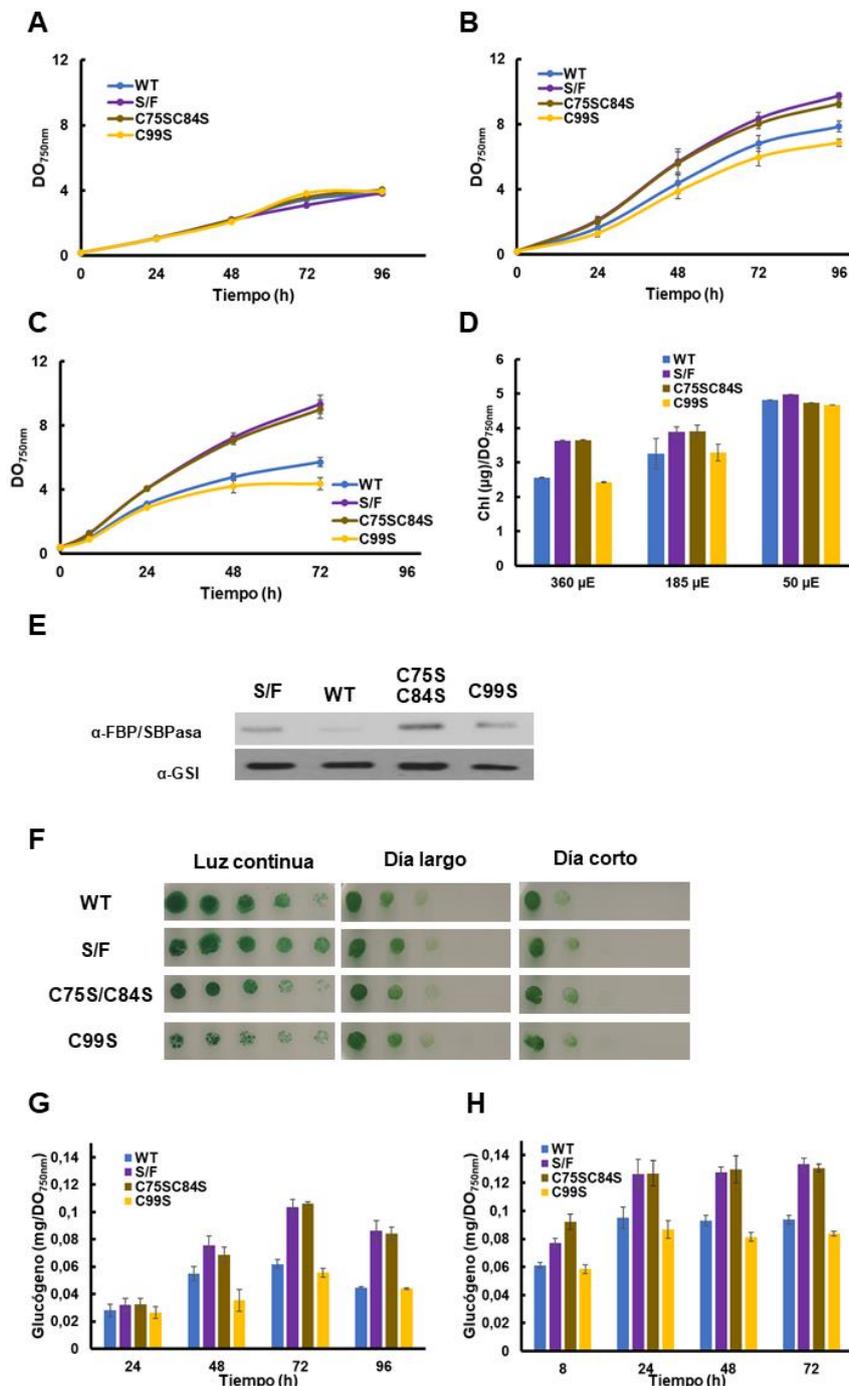


Figura 53. Análisis del fenotipo de los mutantes sobreexpresores de la FBP/SBPasa C75SC84S y C99S. (A) Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), S/F, C75SC84S y C99S cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 50 μmol

fotones·m⁻² ·s⁻¹. **(B)** Crecimiento a 185 μmol fotones·m⁻² ·s⁻¹ igual al del apartado A. **(C)** Crecimiento a 360 μmol fotones·m⁻² ·s⁻¹ igual al del apartado A. **(D)** Cantidad de clorofila normalizada por unidades de densidad óptica a 750 nm realizado de los cultivos de los apartados A, B y C. **(E)** Western Blot de FBP/SBPasa y GSI en las estirpes WT (silvestre), S/F, C75SC84S y C99S del apartado A a las 24 horas. Se cargaron 5 μg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(F)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), S/F, C75S/C84S y C99S en diferentes regímenes de luz. Siendo estas: luz continua, día largo (16 horas de luz) o día corto (8 horas de luz); los cultivos en fase exponencial de cada una de las estirpes se igualaron a DO_{750 nm} de 0,2 y se hicieron 5 diluciones 1/10 sembrándose 5 μl de cada una. En este caso la luz de crecimiento fue de 60 μmol fotones·m⁻² ·s⁻¹. Las placas de día corto se cultivaron durante 11 días mientras que las plazas de día largo y luz continua se mantuvieron durante 7 días. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. **(G)** Medida de glucógeno de las estirpes WT (silvestre), S/F, C75SC84S y C99S del apartado B. **(H)** Medida de glucógeno de las estirpes WT (silvestre), S/F, C75SC84S y C99S del apartado C. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

2.3. Regulación redox de la FBP/SBPasa y la FBPasa *in vivo*.

Puesto que tanto la enzima FBP/SBPasa como la FBPasa son susceptibles de regulación redox, *in vitro*, se intentó correlacionar esto con una regulación redox *in vivo* dependiente de las condiciones de crecimiento. Con esto se buscaba determinar si estas enzimas, al igual que en caso de las enzimas FBPasa y SBPasa de plantas, presentan una regulación mediante reducción dependiente de luz (Montrichard et al., 2009; Gutle et al., 2016).

Para estudiar el estado redox de dichas enzimas en *Synechocystis* se realizaron experimentos de alquilación de proteínas. Por lo que cultivos de las estirpes a analizar se trataron con NEM, molécula que se une a los residuos de cisteína reducidos de las proteínas y es capaz de entrar al interior de las células. Tras esto se obtuvo un extracto de las proteínas de cada estirpe y estos se trataron con DTT. Por tanto, las cisteínas que antes estaban oxidadas formando puentes disulfuro pasan a estar reducidas y tras esto se trataron con MM(PEG24). Este compuesto, al igual que el NEM, se une a las cisteínas reducidas, por lo que en este caso las cisteínas reducidas serían las que inicialmente estaban oxidadas. Como la unión de MM(PEG24) a cada cisteína incorpora 1,24 KDa se puede conocer el grado de oxidación de una proteína atendiendo a su movilidad electroforética pues cuando mayor sea el número de puentes disulfuro que se formen en la proteína mayor número de moléculas de MM(PEG24) se unirán y menor será su movilidad electroforética. Todo esto se realizó siguiendo lo descrito en apartado 3.8. de Materiales y Métodos. Para conocer el patrón generado por ambas FBPasas, dependiendo de su grado de oxidación, se analizó el mismo para las proteínas puras FBP/SBPasa y FBPasa siguiendo este protocolo (Figura 54A). Esto se realizó tanto para las proteínas oxidadas con aire durante 15 horas o 50 μM de Cl₂Cu durante una hora como para las proteínas reducidas con 10 mM de DTT durante una hora.

Puesto que la enzima FBP/SBPasa cuenta con 9 cisteínas (Figura 47) solo con la unión de NEM, a las mismas al estar totalmente reducida, ya se observaba una disminución de la movilidad debido al aumento del peso molecular (Figura 54B). Ya que la FBPasa contaba con solo 3 cisteínas esto no se observó con facilidad (Figura 54C). En cualquier caso, se determinó que las proteínas reducidas presentaban

mayoritariamente una única banda mientras que al oxidarse la FBP/SBPasa presentaba seis bandas donde dos eran mayoritarias, una de más de 65 kDa que posiblemente corresponda a la enzima donde todos los residuos de cisteína estuvieran oxidados y otra de unos 42 kDa. De forma que al oxidarse, incluso perdiendo su actividad, existe una población de la enzima donde no todas sus cisteínas están oxidadas. En el caso de la FBPasa, esta al oxidarse presentó 3 bandas de pesos moleculares muy similares por lo que probablemente ninguno de los dos métodos de oxidación consiguió solamente una población de enzima totalmente oxidada, sino que se obtuvo una mezcla de proteína con diferentes grados de oxidación. Por tanto, puede que presente algún mecanismo para evitar la sobreoxidación.

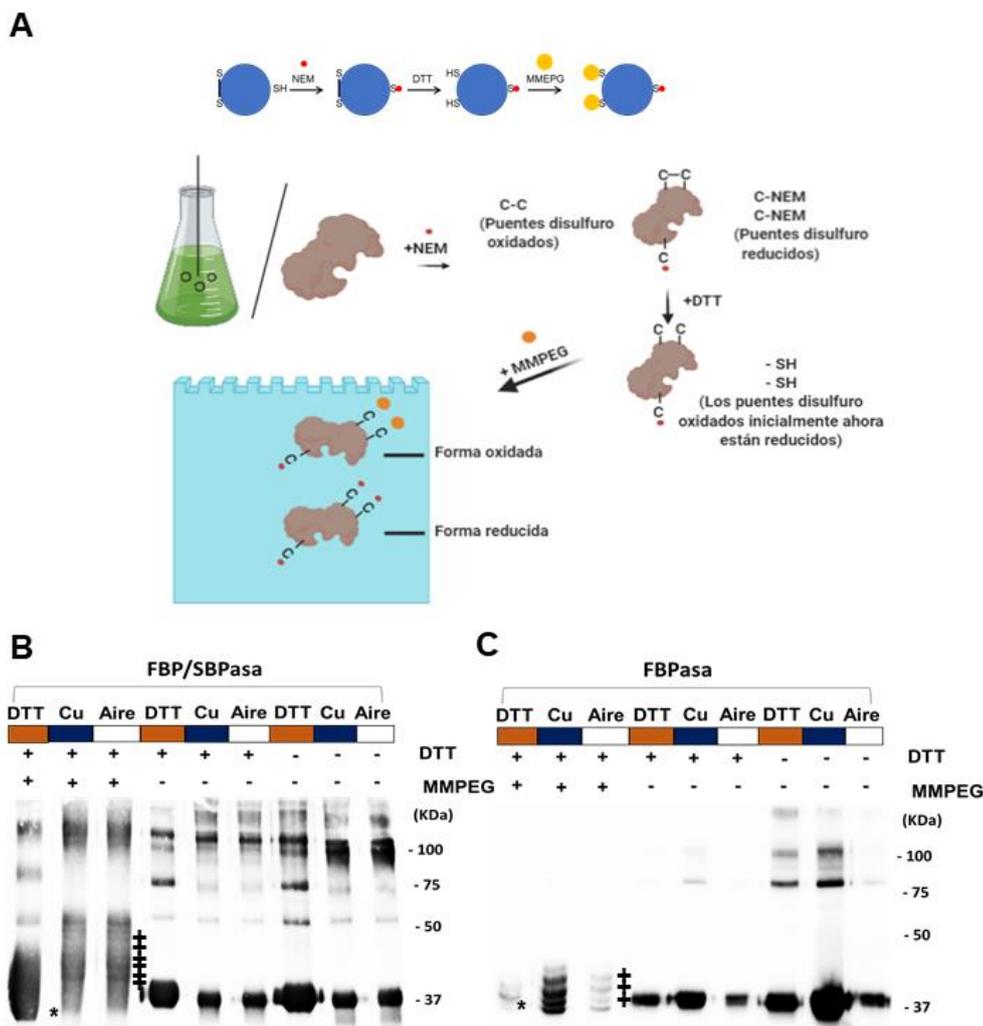


Figura 54. Ensayos de alquilación de las proteínas FBP/SBPasa y FBPasa tras su reducción/oxidación. (A) Esquema del tratamiento realizado y de los cambios sufridos por la proteína en el extracto o purificada tras la adición de NEM y MM(PEG24) (MMPEG), ambas moléculas provocan un incremento en el peso molecular al unirse a cisteínas reducidas y por tanto altera la movilidad electroforética. (B) Western Blot de FBP/SBPasa purificada de *E. coli* tras ser reducida con 10 mM de DTT (DTT), oxidada durante 15 horas con aire (Aire) u oxidada con 50 μ M de Cl_2Cu (Cu). Tras esto el cobre y el DTT se eliminaron mediante filtración en gel. Tras esto se siguió el protocolo descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos. (C) Western blot de FBPasa purificada de *E. coli* tras ser reducida con 10 mM de DTT (DTT), oxidada durante 15 horas con aire (Aire) u oxidada con 50 μ M de Cl_2Cu (Cu). El tratamiento y electroforesis de la proteína fue igual al de apartado A. En ambos la proteína se analizó mediante Western Blot la

movilidad de la proteína. El signo * hace referencia al estado reducido y el signo + al estado oxidado. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

2.3.1. Regulación dependiente de luz.

In vitro se ha demostrado la posible regulación redox de la FBP/SBPasa y de la FBPasa de *Synechocystis* mediada por TrxA (Figura 46). Estudios *in vivo*, con un mutante con niveles de TrxA reducidos señalan que esto podría ser algo extensible a *Synechocystis* ya que el estado de reducción de ambas proteínas se altera (Mallen-Ponce, 2020). Puesto que la regulación realizada por tiorredoxinas está relacionada con la luz, momento en que las tiorredoxinas se reducen gracias a la cadena de transporte electrónico fotosintética (Couturier et al., 2013), se analizó el estado redox de ambas proteínas tras 24 horas de oscuridad (O), una intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (luz de crecimiento estándar) o una intensidad mayor, o alta luz, de 185 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 55).

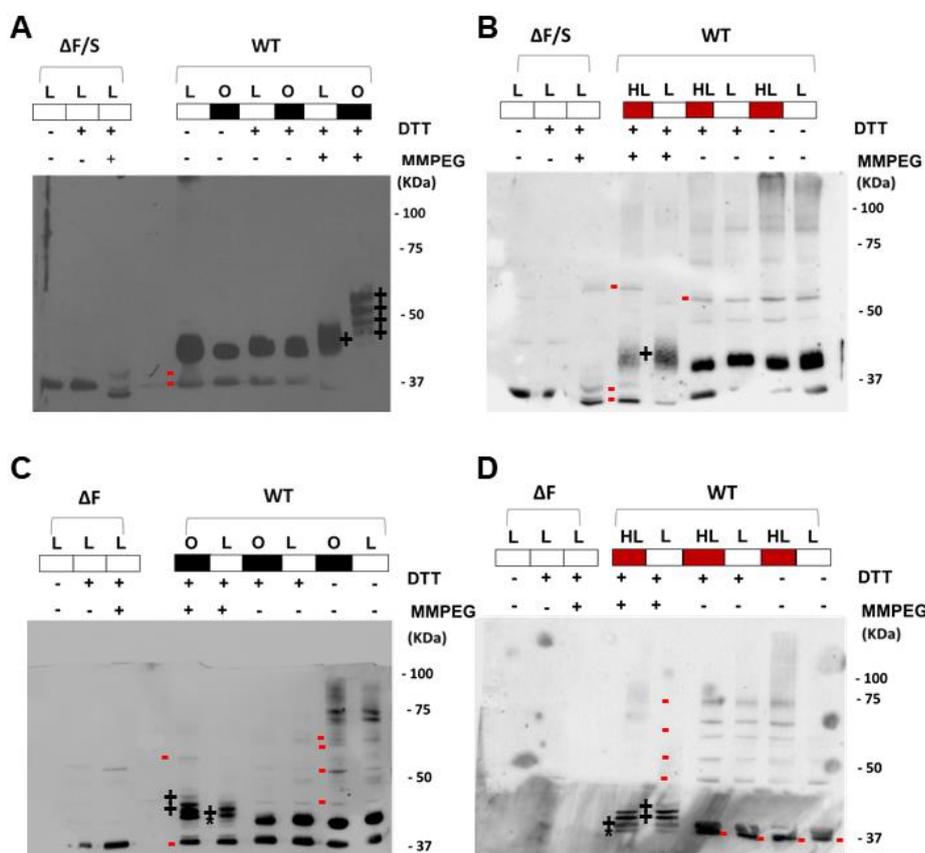


Figura 55. Análisis de los cambios en el estado redox de las proteínas FBPasa y FBP/SBPasa dependientes de luz. (A) Western Blot de FBP/SBPasa de las estirpes WT (silvestre) y $\Delta F/S$, cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en oscuridad (O) o a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (L). A las células se les añadió NEM (10 mM) y en dichas condiciones se extrajeron las proteínas. Tras esto se siguió el protocolo descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos. **(B)** Western Blot de FBP/SBPasa de las estirpes WT (silvestre) y $\Delta F/S$, cultivadas BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en 185 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL) o a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (L). El tratamiento de las células fue igual al de apartado A. **(C)** Western Blot de FBPasa de las estirpes WT (silvestre) y ΔF . Las características del cultivo, el tratamiento de las células fue igual al de apartado A. **(D)** Western Blot de FBPasa en las estirpes WT (silvestre) y ΔF . Las

características del cultivo, el tratamiento de las células fue igual al de apartado A. Los resultados son representativos de, al menos, tres repeticiones biológicas independientes con los mismos resultados. El signo * hace referencia al estado reducido, el signo + al estado oxidado y el signo - a las bandas inespecíficas de cada anticuerpo. En todos los casos se cargaron 20 µg de proteína total y estas se separaron con un gel al 10% mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Posteriormente se analizó por Western Blot. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Como control de cada una de las proteínas se emplearon los mutantes de las mismas ($\Delta F/S$ y ΔF para la FBP/SBPasa y FBPasa respectivamente), buscando así descartar las reacciones inespecíficas del anticuerpo primario con otras proteínas (Figuras 55A, 55B). De esta forma se determinó que la FBP/SBPasa en oscuridad presentaba un mayor grado de oxidación (menor movilidad electroforética debida a la unión de MMPEG a un mayor número de residuos de cisteínas) que en condiciones de luz de crecimiento estándar ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 55A). Por tanto, la FBP/SBPasa en oscuridad presentaría una actividad menor ya que en esta enzima la forma funcional es la forma reducida (Figura 48) (García-Cañas, 2015). En el caso de la proteína FBPasa también se observó un cambio similar, pues en células mantenidas 24 horas en oscuridad aumentaba la forma oxidada (Figura 55C). En el caso del crecimiento a alta luz, a pesar de que el estado redox de TrxA no cambia con respecto a luz de crecimiento normal (Mallen-Ponce, 2020), tanto para la enzima FBP/SBPasa como para la enzima FBPasa el grado de reducción de la proteína aumentaba ligeramente (mayor movilidad electroforética; Figuras 55B, 55D). Por tanto, en alta luz la enzima FBP/SBPasa estará más activa mientras que la proteína FBPasa estará en una forma aún más inactiva. En el caso de la FBP/SBPasa en ningún momento se observó exclusivamente la banda que corresponde a la enzima totalmente reducida, por lo que probablemente lo que se produce, de forma dependiente de luz, es una menor o mayor oxidación, pero en ningún caso una reducción total. En el caso de la FBPasa tampoco se alcanzó una forma totalmente reducida, a pesar de que la banda correspondiente a esta sí estuviera representada, de forma que siempre se detectó una fracción correspondiente a la forma oxidada.

Así, la FBP/SBPasa sería principalmente activa en condiciones de luz, siendo mayor su activación a mayor luz de crecimiento. Por lo que estaría activa a la vez que el transporte electrónico fotosintético; lo que concuerda con su papel en el ciclo de CBB. Sin embargo, la FBPasa sería funcional en condiciones de crecimiento en oscuridad, siendo más inactiva cuanto mayor intensidad de luz. De forma que estaría relacionada con las principales rutas de catabolización de la glucosa.

2.3.2. Regulación dependiente de las condiciones tróficas.

Ya que dependiendo de las condiciones de crecimiento unas u otras rutas de asimilación de la glucosa son más activas (Chen et al., 2016; Ueda et al., 2018; Makowka et al., 2020) se estudió el cambio en el estado redox de ambas proteínas en fotoautotrofia, mixotrofia (G), o fotoheterotrofia (G+D). Cuando la estirpe silvestre creció con una intensidad baja de luz ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 56A, 56C) el grado de oxidación de ambas proteínas en las tres condiciones fue igual. Por tanto, la actividad de ambas se mantenía constante independientemente de si había una fuente de carbono externa mientras crecieran en baja luz. Sin embargo, el grado de

oxidación de ambas proteínas fue mayor respecto a aquellas que crecieron en luz estándar (Figuras 55A, 55C, 56A, 56C).

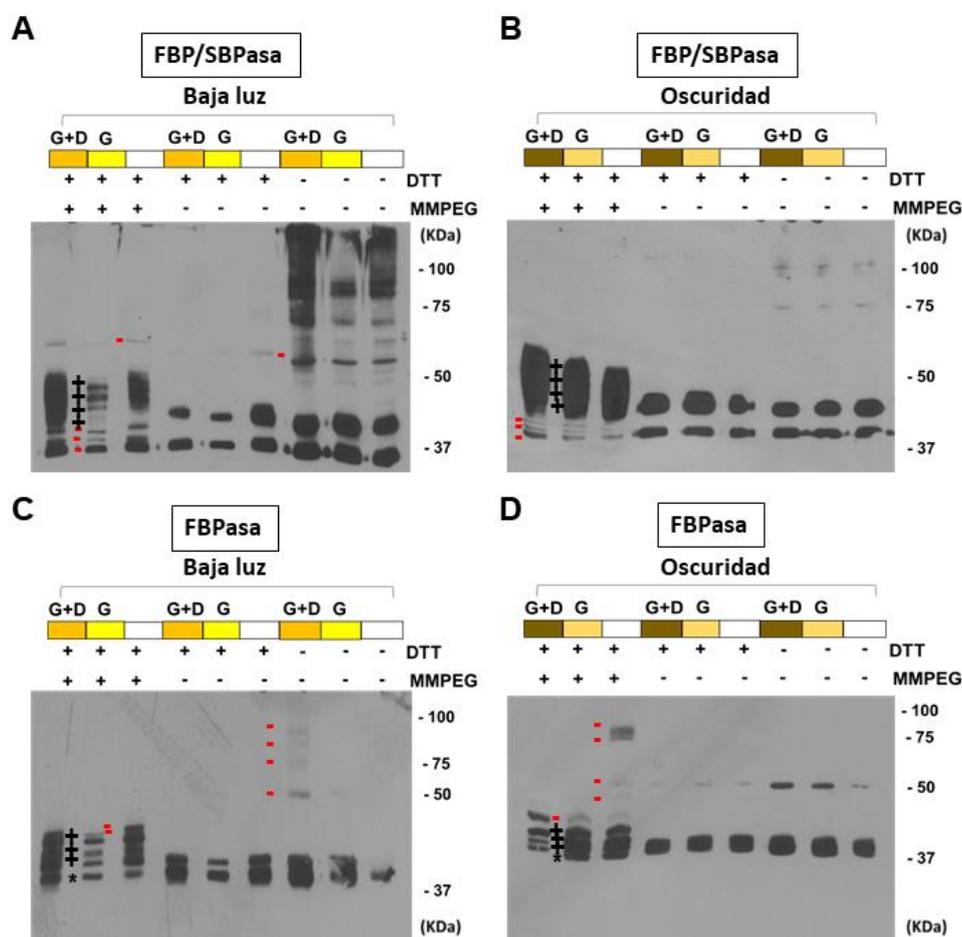


Figura 56. Análisis de los cambios en el estado redox de las proteínas FBP/SBPasa y FBPasa en autotrofia, mixotrofia y heterotrofia. (A) Western Blot de FBP/SBPasa en la estirpe WT (silvestre), cultivada en BG11c, BG11c con glucosa 10 mM (G) o BG11c con glucosa 10 mM (G+D) y DCMU 50 μ M burbujado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 5 μ mol fotones·m⁻²·s⁻¹ durante 24 horas. A las células se les añadió NEM (10 mM) y en dichas condiciones se extrajeron las proteínas. Tras esto se siguió el protocolo descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos. (B) Western Blot de FBP/SBPasa en la estirpe WT (silvestre), cultivada en BG11c, BG11c con glucosa 10 mM o BG11c con glucosa 10 mM y DCMU 50 μ M burbujado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ y oscuridad durante 24 horas. El tratamiento de las células fue igual al de apartado A. Posteriormente se analizó por Western Blot la cantidad de proteína. (C) Western Blot de FBPasa en la estirpe WT (silvestre). Las condiciones de cultivo, el tratamiento de las células fue igual al de apartado A. Posteriormente se analizó por Western Blot la cantidad de proteína. (D) Western Blot de FBPasa en la estirpe WT (silvestre). Las condiciones de cultivo, el tratamiento de las células fue igual al de apartado A. Posteriormente se analizó por Western Blot la cantidad de proteína. Los resultados son representativos de, al menos, tres repeticiones biológicas independientes con los mismos resultados. El signo * hace referencia al estado reducido, el signo + al estado oxidado y el signo - a las bandas inespecíficas de cada anticuerpo. En todos los casos se cargaron 20 μ g de proteína total y estas se separaron con un gel al 10% mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Posteriormente se analizó por Western Blot. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Para determinar si, al presentar regulación redox mediada por luz, la baja intensidad de esta impedía ver diferencias en la oxidación de las proteínas en las diferentes condiciones tróficas, se realizó el mismo experimento solo que los cultivos se

mantuvieron durante 24 horas en dichas condiciones en oscuridad (Figura 56B, 56D). Asegurando así que no haya transporte electrónico fotosintético en la estirpe silvestre. En dichas condiciones el estado redox de las proteínas en oscuridad fue similar a su estado tras crecer a $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 56). Sin embargo, en el caso de la FBP/SBPasa, cuando creció en oscuridad con glucosa en el medio el estado de oxidación de la misma aumento (Figura 56B). Para la FBPasa se obtuvieron los mismos resultados, aumentando así su estado de oxidación ante la presencia de glucosa en el medio (Figura 56D). Cuando crecieron en oscuridad con disponibilidad de glucosa y DCMU fue cuando alcanzaron su mayor grado de oxidación, lo que podría deberse a que en dichas condiciones se potencie más la oxidación de las proteínas reguladoras que reducen a ambas FBPasas o un incremento de moléculas oxidantes, algo que no ocurriría cuando había luz disponible. Esto indicaba que, incluso cuando se añadió un compuesto que impedía el flujo lineal de electrones como es el DCMU, el grado de oxidación dependía de la disponibilidad o no de luz (Figura 56). De forma que posiblemente parte de los electrones obtenidos de la oxidación de la glucosa tendrán como destino la reducción de la ferredoxina en lugar de la respiración.

3. Determinación de la esencialidad de las actividades SBPasa y FBPasa para el crecimiento fotoautotrófico.

La pérdida de la enzima FBP/SBPasa genera una estirpe ($\Delta F/S$) incapaz de crecer sin una fuente reducida de carbono como es la glucosa (Yan y Xu, 2008; García-Cañas, 2015) (Figura 40E). Puesto que en condiciones de mixotrofia o en las primeras horas de su crecimiento fotoautotrófico (previas a su muerte) la estirpe genera oxígeno (Figura 43) esta incapacidad probablemente no se deba a un problema en la cadena de transporte electrónico fotosintética sino a un problema en el ciclo de CBB. Puesto que fue imposible segregarse el doble mutante $\Delta F/\Delta F$ (Figura 57B) la existencia de una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa debe ser esencial para este crecimiento en mixotrofia y fotoheterotrofia. Puesto que tanto la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa como la actividad sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa son necesarias para la fijación de carbono mediante el ciclo CBB se decidió analizar si la expresión de un gen que codifica una sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa permitiría el crecimiento fotoautotrófico con la presencia de la FBPasa cianobacteriana. Por tanto, para determinar si con la adición de una actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa el mutante $\Delta F/S$ crecería sin una fuente de carbono exógeno, se intentó recuperar el fenotipo silvestre de este mutante mediante la expresión de la SBPasa de *A. thaliana* (SBPasaAt). En el caso de que la FBPasa de *Synechocystis* no presentase suficiente actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa, también se generaron mutantes que expresaban la FBPasa de *P. sativum* (FBPasaPs). Posteriormente, se introdujo la FBPasa cloroplastídica a los mutantes que expresaban la SBPasa, obteniéndose así estirpes donde el sistema FBPasa-SBPasa sería el mismo al cloroplasto de plantas. En todos los casos la eliminación de la FBP/SBPasa se realizó como la última transformación y aquellos que carecían de esta enzima fueron segregados fotoheterotróficamente.

Para generar las estirpes donde se expresara la SBPasa de *A. thaliana* (estirpe S) de forma constitutiva se transformó la estirpe silvestre de *Synechocystis* con el plásmido pNRSD_PcpcB_hisAtSBPsa (Figura 57A) y para la estirpe $\Delta F+S$ se

transformó la estirpe ΔF . Posteriormente estas estirpes se transformaron con el plásmido pslr2094_Ery (García-Cañas, 2015) generándose también las estirpes $\Delta F/S+S$ e $\Delta F/S\Delta F+S$. Todas las estirpes generadas que expresaban la SBPasaAt se comprobaron por PCR (Figura 57B) y la acumulación de esta proteína se estudió mediante Western Blot (Figura 57C).

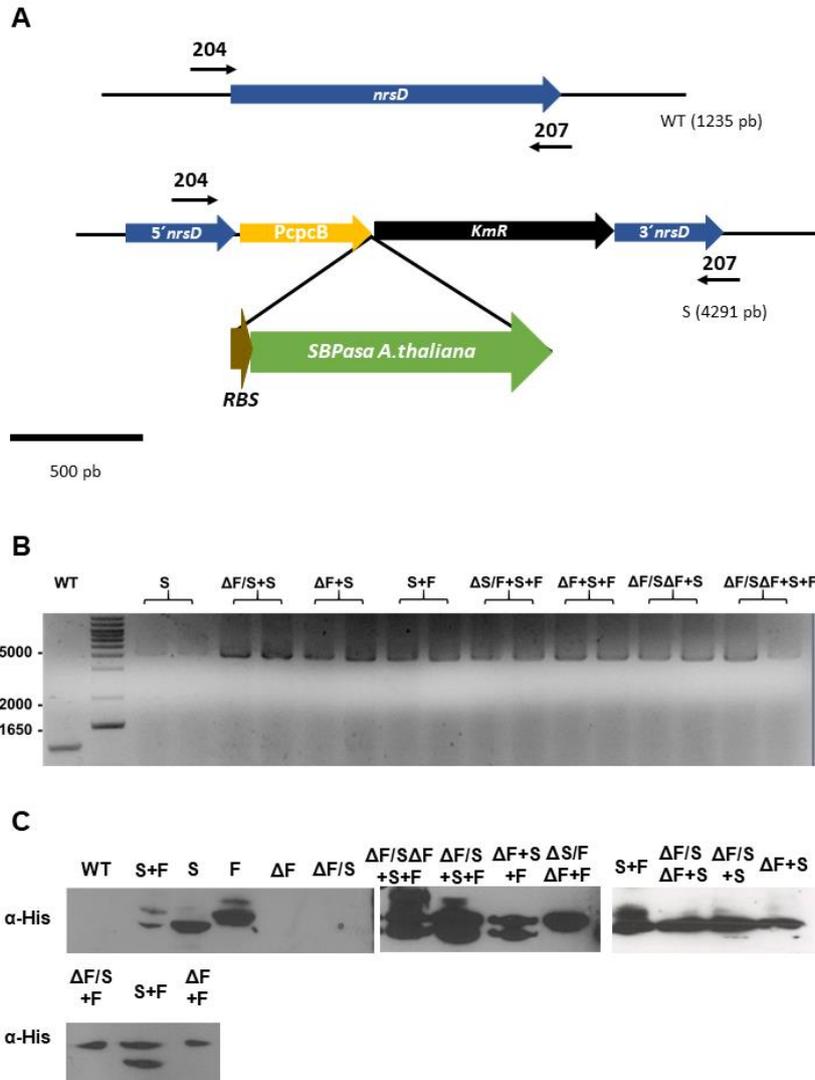


Figura 57. Construcción de las estirpes sobreexpresoras de la SBPasaAt. (A) Representación esquemática de la región génica de *nrsD* en la estirpe WT (silvestre) y las estirpes que expresaban la SBPasaAt. La secuencia codificante de esta proteína presenta una cola de histidinas y se expresó bajo un promotor constitutivo con un sitio de unión al ribosoma (RBS) de *E. coli*. **(B)** Análisis mediante PCR de la segregación de las estirpes empleando los oligonucleótidos 204 y 207. **(C)** Western Blot contra las proteínas con cola de histidina en las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, ΔF , S, F, S+F, $\Delta F/S+S$, $\Delta F+S$, $\Delta F/S+F$, $\Delta F+F$, $\Delta F/S+S+F$, $\Delta F/S\Delta F+S$, $\Delta F/S\Delta F+F$, $\Delta F/S\Delta F+S+S$ cultivadas en BG11c con glucosa 10 mM y burbujeadas con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 a $5 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se cargaron 350 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 10% mediante electroforesis SDS-PAGE. En las estirpes con dos bandas la banda inferior corresponde a la de la SBPasaAt. El anticuerpo empleado en estos análisis, así como su concentración, está descrito en la Tabla 12.

Para generar la estirpe donde se expresase de forma constitutiva la SBPasaPs (F) la estirpe silvestre de *Synechocystis* se transformó con el plásmido

*glnN*_FBPasa_guisante, donde este gen se introdujo en *glnN* (Figura 58A). Con este plásmido también se transformaron las estirpes ΔF , $\Delta F+S$ y S; generándose las estirpes F, $\Delta F+F$, $\Delta F+F+S$ y S+F. Una vez segregadas estas estirpes se transformaron con el plásmido *pslr2094_Ery* (García-Cañas, 2015); generándose así las estirpes $\Delta F/S+F$, $\Delta F/S\Delta F+F$, $\Delta F/S\Delta F+F+S$ e $\Delta F/S+S+F$. La segregación de todas las estirpes que contenían esta construcción se comprobó por PCR de colonias (Figura 58B) y la acumulación de la proteína se verificó mediante Western Blot (Figura 58C).

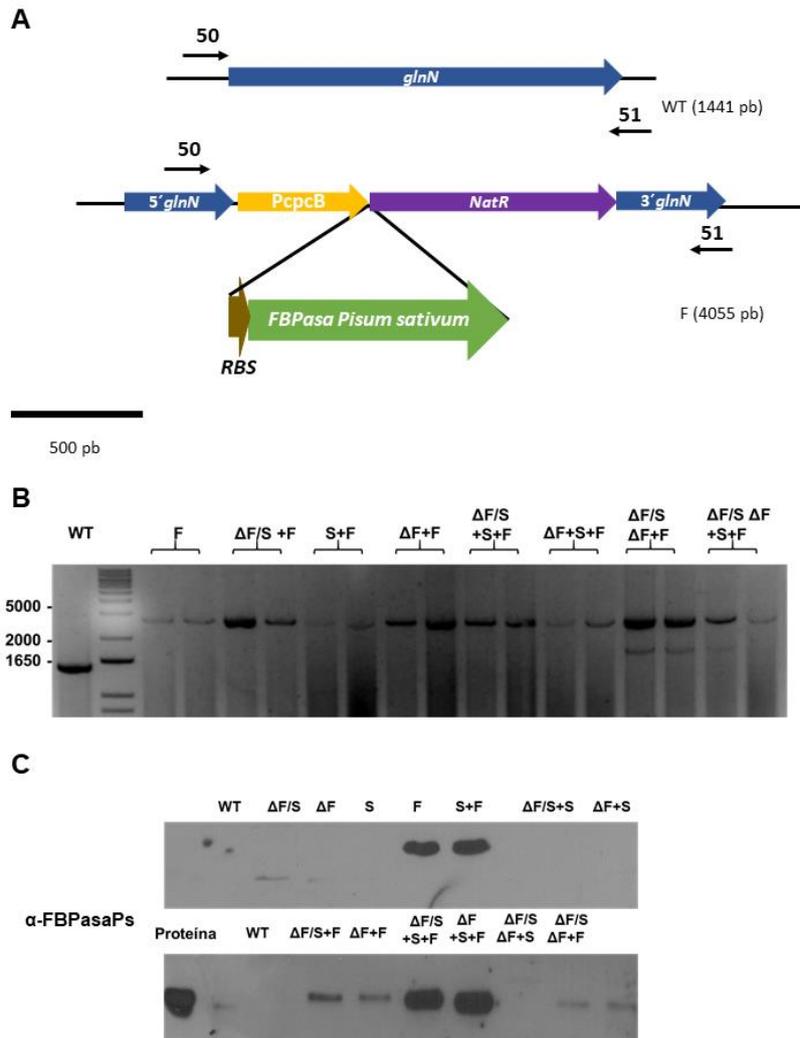


Figura 58. Construcción de las estirpes que expresaban la FBPasaPs. (A) Representación esquemática de la región génica *glnN* tanto en la estirpe WT (silvestre) como en las estirpes que expresaban la FBPasaPs. La secuencia codificante para la FBPasaPs presenta, además, una cola de histidinas y se encontraba bajo un promotor constitutivo con un sitio de unión al ribosoma (RBS) de *E. coli*. **(B)** Análisis mediante PCR de la segregación de las estirpes que contenían la FBPasa cloroplastídica de *P. sativum* usando los oligonucleótidos 50 y 51. **(C)** Western Blot de la FBPasaPs en las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, ΔF , S, F, S+F, $\Delta F/S+S$, $\Delta F+S$, $\Delta F/S+F$, $\Delta F+F$, $\Delta F/S+S+F$, $\Delta F/S\Delta F+S$, $\Delta F/S\Delta F+F$, $\Delta F/S\Delta F+F+S$ cultivadas en BG11c con glucosa 10 mM y burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 a $5 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se cargaron 5 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. El anticuerpo empleado en este análisis, así como su concentración, está descrito en la Tabla 12.

Previamente al estudio de las mismas se comprobó que todas las estirpes generadas sobre fondo ΔF conservaran esta característica y que las estirpes $\Delta F/S$ no expresaran la proteína FBP/SBPasa (Figura 59). De forma que se analizó su segregación mediante PCR y la expresión de ambas proteínas mediante Western Blot en estirpes cultivadas en mixotrofia.

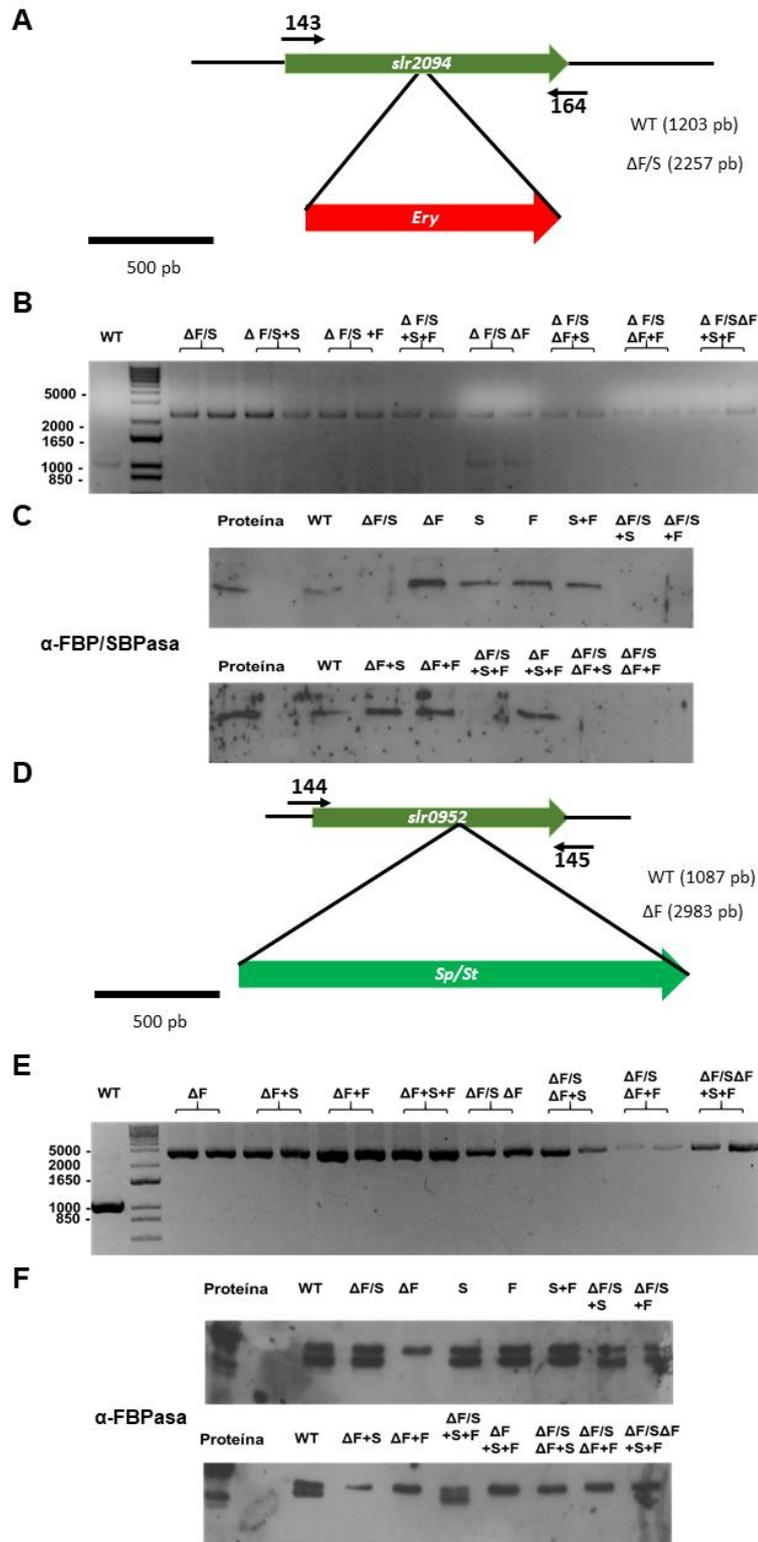


Figura 59. Comprobación de las estirpes $\Delta F/S$ y ΔF . (A) Representación esquemática de la región génica *slr2094* en los mutantes carentes de la FBP/SBPasa (B) Análisis mediante PCR

de la segregación de las estirpes señalas usando los oligonucleótidos 143 y 164. **(C)** Western Blot de la FBP/SBPasa en las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, ΔF , S, F, S+F, $\Delta F/S+S$, $\Delta F+S$, $\Delta F/S+F$, $\Delta F+F$, $\Delta F/S+S+F$, $\Delta F/S\Delta F+S$, $\Delta F/S\Delta F+F$, $\Delta F/S\Delta F+F+S$. Estas fueron cultivadas en BG11c con glucosa 10 mM y gaseo al 1% CO₂ a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se cargaron 5 μg de proteína total de los extractos solubles de cada estirpe y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(D)** Representación esquemática de la región génica *slr0952* en los mutantes carentes de la FBPasa **(E)** Análisis por PCR de la segregación de las estirpes señalas usando los oligonucleótidos 144 y 145. **(F)** Comprobación mediante Western Blot de la presencia de la FBPasa. Las estirpes analizadas, sus condiciones de cultivo y la separación de las proteínas son iguales a las del apartado C. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

3.1. Análisis de la complementación con la SBPasa de *Arabidopsis thaliana*.

Estudios realizados en plantas demuestran que, aunque tanto la FBPasa como la SBPasa participan en el ciclo de CBB, la SBPasa ocuparía un papel más importante en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (Tamoi et al., 2006). La estirpe $\Delta F/S$ ya cuenta con una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa, a pesar de que esta presenta una regulación contraria estando más activa en oscuridad. Puesto que es posible obtener el mutante $\Delta F/S$ en esta estirpe, la actividad FBPasa debe ser suficiente en mixotrofia y fotoheterotrofia. Por lo que existía la posibilidad de que la FBPasa fuera capaz de cumplir eficientemente la función fructosa-1, 6-bisfosfatasa en la fijación de carbono. De forma que, mediante la expresión de la SBPasaAt y la FBPasa endógena se pudiera reconstruir el ciclo; de ser así el mutante $\Delta F/S+S$ debería ser capaz de sobrevivir fotoautotróficamente.

Puesto que las enzimas SBPasas presentan cierta actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa (Gutle et al., 2016) y se quería determinar la esencialidad exclusivamente de actividad la SBPasa, se comprobó la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de la SBPasaAt. Para esto la enzima se indujo y purificó de BL21 mediante una cromatografía de afinidad por níquel y se determinó la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa *in vitro* con la medida del desprendimiento de fósforo tras adicionar la enzima y fructosa-1, 6-bisfosfato a una mezcla con tampón a pH 8 y 15 mM de magnesio. De esta forma se comprobó que la actividad FBPasa de la enzima totalmente reducida era muy baja, siendo esta solo un 2,4% de la actividad total de la enzima FBP/SBPasa reducida (Figura 60A). Aun así, destacó la segregación de la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$ que no contaba con ninguna de las FBPasas de *Synechocystis* mientras que el doble mutante que simplemente no expresaba ninguna enzima de planta, no era capaz de segregar (Figuras 59). Por lo que la expresión de esta proteína debe suplementar suficiente actividad FBPasa para sobrevivir con una fuente de carbono exógeno (Figura 60). Puesto que la enzima FBPasa de *Synechocystis* no cuenta con actividad sedoheptulosa-1, 7- bisfosfatasa (Tamoi et al., 1996) pero permite la supervivencia de la estirpe $\Delta F/S$ debe ser necesario una mínima actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa, y por tanto probablemente cierto flujo de carbono por la vía OPP, para crecer en mixotrofia y fotoheterotrofia.

Posteriormente se comprobó si la expresión de esta enzima era capaz de recuperar el fenotipo de la estirpe $\Delta F/S$ (Figura 60B, 60C), permitiendo que fuera capaz de crecer fotoautotróficamente. Para esto se estudió el crecimiento de las estirpes silvestre, S, $\Delta F/S+S$ y $\Delta F/S\Delta F+S$ en medio sólido y fotoautotrofia, mixotrofia y

fotoheterotrofia. Las estirpes crecieron en mixotrofia hasta su fase exponencial cuando se lavaron y se realizaron diluciones seriadas de las mismas. También se comprobó en medio líquido mediante la medida del crecimiento de las anteriores estirpes además de las estirpes ΔF , $\Delta F/S$ e $\Delta F+S$ en estas mismas condiciones tróficas. Con estos experimentos se determinó que la estirpe $\Delta F/S+S$ seguía siendo incapaz de crecer sin una fuente de carbono exógeno tanto en medio líquido (Figura 60C) como en medio sólido (Figura 60B).

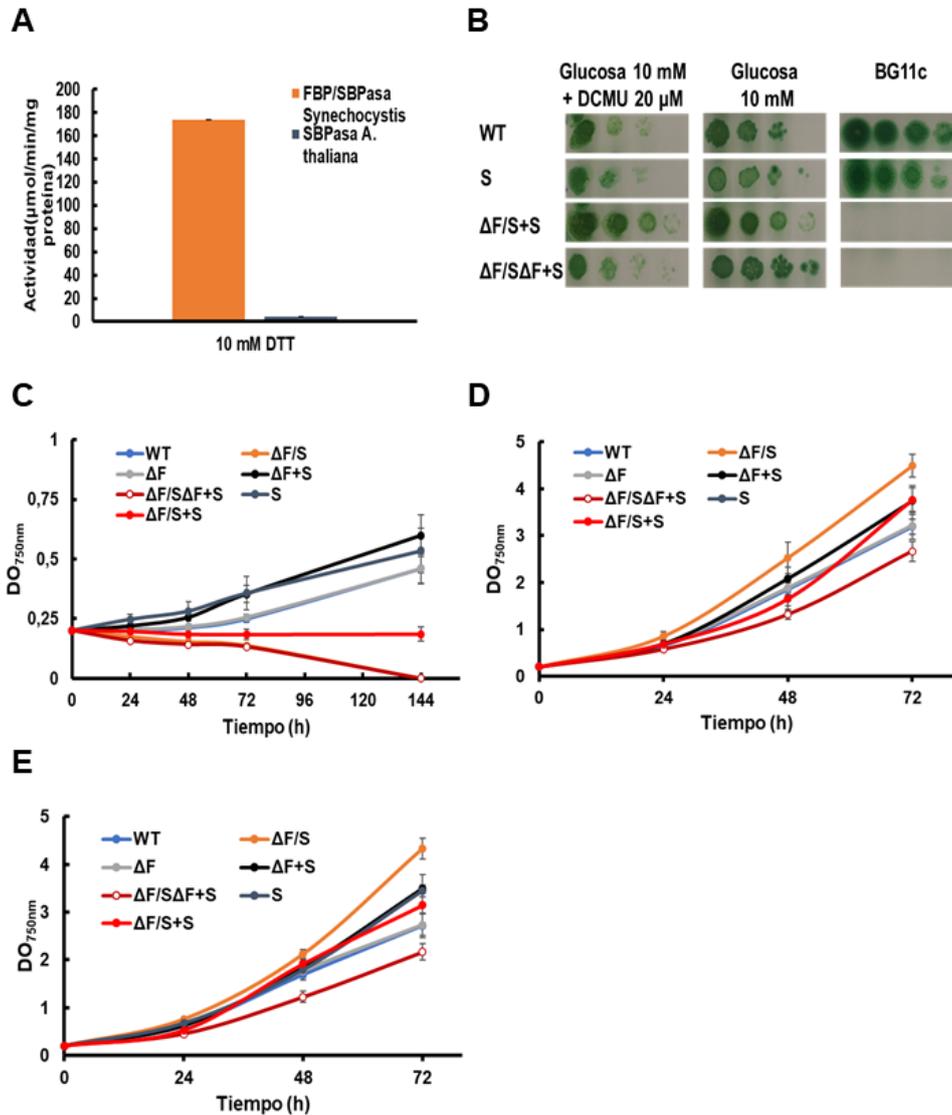


Figura 60. Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia de las estirpes sobreexpresoras de la SBPasaAt. (A) Ensayo de la actividad FBPasa en preparaciones de las enzimas FBP/SBPasa y SBPasaAt oxidadas con aire y tratada con 10 mM de DTT. **(B)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), S, $\Delta F/S+S$ e $\Delta F/S\Delta F+S$ en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia. Se realizaron diluciones seriadas partiendo de 0,2 DO_{750nm} de las diferentes estirpes cultivadas en mixotrofia hasta su fase exponencial y se dejaron crecer durante 6 días en baja luz. **(C)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, ΔF , S, $\Delta F/S+S$, $\Delta F/S\Delta F+S$ e $\Delta F+S$ en agitación y fotoautotrofia **(D)** fotoheterotrofia y **(E)** mixotrofia. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los experimentos de crecimiento se realizaron a baja luz 5 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹

Aunque las estirpes que expresaban la SBPasaAt no recuperaron el fenotipo del mutante $\Delta F/S$, sí que presentaron diferencias con respecto a esta estirpe en el crecimiento ante diferentes condiciones tróficas. En condiciones de fotoheterotrofia y mixotrofia (Figura 60D, 60E) las estirpes S y $\Delta F+S$ mostraron un crecimiento similar entre ellas, que a su vez era ligeramente más rápido que el de las estirpes ΔF o silvestre, pero más lento que el de la estirpe $\Delta F/S$. Sin embargo, cuando se expresó sobre un mutante $\Delta F/S$ afectó negativamente a su crecimiento, puesto que el mutante $\Delta F/S+S$ crece más lentamente que el mutante $\Delta F/S$ con una fuente de carbono exógena. Al comprobar el crecimiento del mutante carente de ambas enzimas de cianobacteria y que, a su vez, expresaba la SBPasaAt ($\Delta F/S \Delta F$) se determinó que crecía más lentamente que la estirpe silvestre. En condiciones fotoautotróficas a baja luz de crecimiento ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el crecimiento estuvo favorecido para aquellas estirpes que expresaron la enzima de plantas capaces de sobrevivir, es decir aquellas que no carecían de la enzima bifuncional. Por lo que las estirpes S e $\Delta F+S$ crecieron más rápidamente en medio líquido en dichas condiciones que la estirpe silvestre (Figura 60C).

3.2. Análisis de la complementación con la FBPasa cloroplastídica de *Pisum sativum*.

Ya que el mutante $\Delta F/S$ cuenta con otra enzima que presenta actividad FBPasa (codificada por *slr0952*) pero esta tiene una regulación contraria a la FBP/SBPasa (mayoritariamente inactiva en condiciones de luz ambiental (Figuras 45, 55)), se especuló sobre que una actividad FBPasa regulada positivamente por luz fuera necesaria para crecer fotoautotróficamente. Pues se había determinado que no era la falta de una actividad SBPasa quien impedía esto (Figura 60). De forma que, puesto que la FBPasa endógena no aportaba una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa suficiente como para realizar el ciclo CBB, se procedió a determinar si con una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa activada al reducirse el mutante $\Delta F/S$ podía crecer fotoautotróficamente. Para ello se analizaron los mutantes que expresaban la FBPasaPs, una enzima que se regula positivamente por luz, concretamente por las tiorredoxinas tipo *f* (Michelet et al., 2013; Gutle et al., 2016; Fernández-Trijueque et al., 2019). De la misma forma, si existiera un método alternativo a la actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa para regenerar ribulosa-1, 5-bisfosfato la estirpe $\Delta F/S+F$ debería poder sobrevivir fotoautotróficamente.

3.2.1. Complementación de la estirpe $\Delta F/S$ por la expresión de una FBPasa cloroplastídica.

Para comprobar si la expresión de una enzima FBPasa cloroplastídica era capaz de recuperar el fenotipo de la estirpe $\Delta F/S$ y permitía que esta estirpe creciera fotoautotróficamente se analizó el crecimiento de las estirpes segregadas F, $\Delta F/S+F$, $\Delta F/S\Delta F+F$, $\Delta F/S$, ΔF y silvestre en medio sólido y líquido (Figuras 58, 61A, 61B). Para comprobar el crecimiento en medio sólido las estirpes F, $\Delta F/S+F$, $\Delta F/S\Delta F+F$ y silvestre se cultivaron en mixotrofia y tras llegar a su fase exponencial se realizaron diluciones seriadas de las mismas en placas y fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia. Por otro lado, también se analizó mediante el análisis de su crecimiento en medio líquido y fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia. Como en

caso de la expresión de la SBPasaAt solo con la introducción de la FBPasaPs no se recuperaba el fenotipo de la estirpe $\Delta F/S$, pues solo fue capaz de crecer en fotoheterotrofia o mixotrofia, tanto en medio líquido como en medio sólido (Figura 61). Esto señala que realmente no hay una ruta alternativa que permita la fijación de carbono sin una actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa.

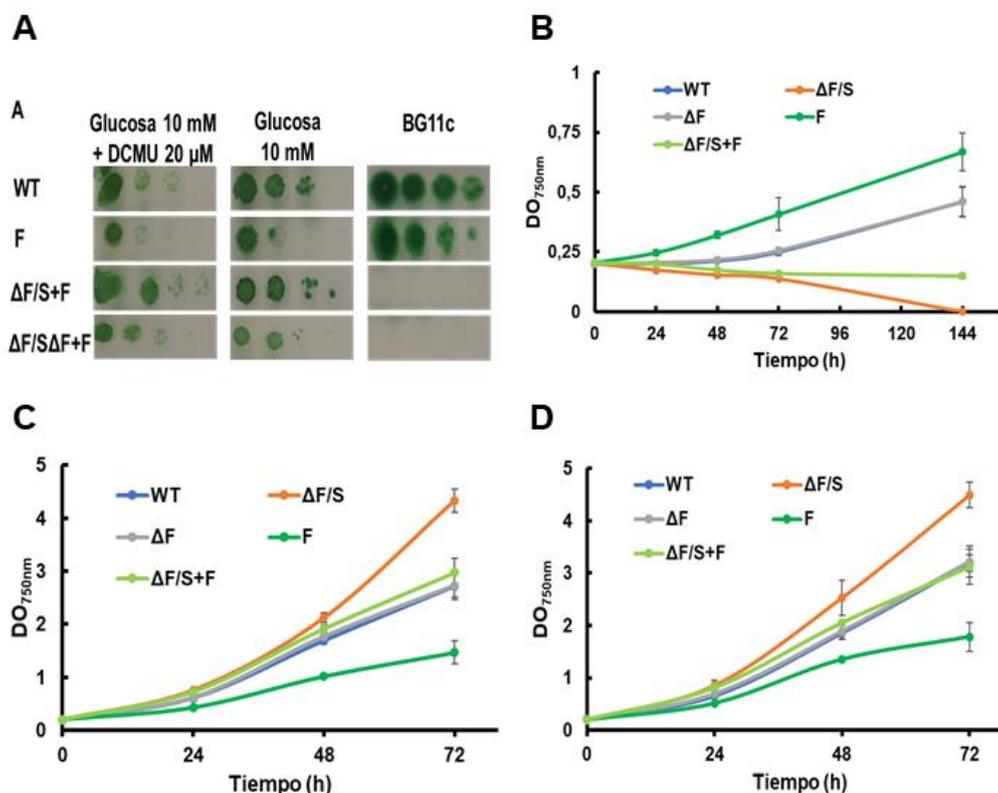


Figura 61. Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia de las estirpes sobreexpresoras de la FBPasaPs. (A) Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), F e $\Delta F/S+F$ en fotoheterotrofia, mixotrofia y fotoautotrofia. Se realizaron diluciones seriadas partiendo de 0,2 DO_{750nm} de las diferentes estirpes cultivadas en mixotrofia hasta su fase exponencial y se dejaron crecer durante 6 días en baja luz. **(B)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, ΔF , F e $\Delta F/S+F$ en agitación y fotoautotrofia **(C)** fotoheterotrofia y **(D)** mixotrofia. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los experimentos de crecimiento se realizaron a baja luz $5 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

En el caso de la estirpe $\Delta F/S+F$ en mixotrofia y fotoheterotrofia creció de forma similar a las estirpes ΔF y silvestre, a diferencia de la estirpe $\Delta F/S$ que creció más rápidamente. Ya que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+F$ fue capaz de segregar (Figura 58), a pesar de seguir necesitando una fuente de carbono exógena para crecer (Figura 61), esto señalaba que realmente es necesaria una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa, independientemente de su regulación, para crecer en mixotrofia o fotoheterotrofia (metabolizar glucosa). Además, la estirpe $\Delta F/S\Delta F+F$ creció más lentamente que las estirpes $\Delta F/S+S$ y $\Delta F/S+F$ (Figuras 60, 61). A diferencia del resultado de la sobreexpresión de la SBPasaAt sobre el fondo silvestre, la sobreexpresión de la FBPasaPs ejerció un efecto negativo con respecto al crecimiento en fotoheterotrofia y mixotrofia. La estirpe F presentó, en dichas condiciones, un crecimiento no solo menor que el de la estirpe silvestre, sino incluso menor al de la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$.

3.3. Análisis de la expresión conjunta de la FBPasa y SBPasa de planta.

Puesto que la expresión por separado de la SBPasaAt o la FBPasaPs no consiguió revertir el fenotipo del mutante $\Delta F/S$ (Figuras 60, 61) se determinó que las actividades SBPasa y FBPasa eran esenciales para el crecimiento fotoautotrófico y que, a su vez, la actividad FBPasa era necesaria para el crecimiento en mixotrofia/fotoheterotrofia. Puesto que se habían generado estirpes que presentaban ambas enzimas de planta ($S+F$, $\Delta F/S+S+F$, $\Delta F/S\Delta F+S+F$ e $\Delta F+S+F$) se procedió a analizar las características de las mismas en diferentes condiciones tróficas (Figura 62).

3.3.1. Recuperación del crecimiento fotoautotrófico del mutante $\Delta F/S$.

Para determinar el efecto de la expresión conjunta de ambas proteínas se analizaron las estirpes que contaban con estas tanto en medio sólido como en medio líquido. En ambos casos esto se analizó de igual forma a lo realizado en los apartados 3.1.1. y 3.2.1. De este modo se determinó que al presentar ambas enzimas se revertía el fenotipo del mutante $\Delta F/S$, siendo estas estirpes capaces de sobrevivir en fotoautotrofia (Figura 62A). Así, ambas FBPasas de cianobacteria podían ser sustituidas por las enzimas de planta y crecer fotoautotróficamente, obteniéndose así una situación similar a lo que ocurre en el cloroplasto relativo a estas dos actividades. Sin embargo, estas estirpes generadas presentan un fenotipo, en su crecimiento, similar al de la estirpe F pues en todas las condiciones este era más lento que el de la estirpe silvestre (Figura 62). En cuanto a los cultivos en medio líquido se determinó que la estirpe $\Delta F/S+S+F$ presentaba un crecimiento similar en fotoautotrofia, aunque levemente menor, al del silvestre (con una baja luz de crecimiento), mientras que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S+F$ crecía más lentamente que ambas (Figura 62B). En cuanto al crecimiento en mixotrofia tanto el crecimiento de la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S+F$ como el de $\Delta F/S+S+F$ fue inferior al del silvestre y, por tanto, muy inferior al de la estirpe $\Delta F/S$ (Figura 62C). Ambas presentaron una velocidad de crecimiento muy similar en estas condiciones. Por lo que la regulación de estas enzimas en mixotrofia parece ser menos eficiente que la de la FBP/SBPasa que presentaba la estirpe silvestre.

Cuando las estirpes $\Delta F/S\Delta F+S+F$ y $\Delta F/S+S+F$ se cultivaron a luz de crecimiento estándar ($50 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) la velocidad de crecimiento de las mismas se vio afectada de forma severa. Estas estirpes presentaron un retraso con respecto a la estirpe silvestre que fue más acusado en la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S+F$ (Figura 62D). Por lo que la FBPasa de *Synechocystis* debe favorecer el crecimiento en la estirpe $\Delta F/S+S+F$, respecto a $\Delta F/S\Delta F+S+F$, a pesar de no estar totalmente oxidada en dichas condiciones. Sin embargo, cuando se cultivaron en mixotrofia a luz de crecimiento estándar supuso una ventaja no expresar la FBPasa de cianobacteria (Figura 62E); puesto que en dichas condiciones el crecimiento de la estirpe $\Delta F/S+S+F$ presenta un mayor retraso respecto a la estirpe silvestre mientras que el de la $\Delta F/S\Delta F+S+F$ crece a una velocidad similar a la que crecía sin glucosa en el medio (Figura 62C). Por tanto, la expresión de la FBPasa supuso una desventaja en condiciones de mixotrofia en los mutantes que expresaban las enzimas de planta. La diferencia en el crecimiento fotoautotrófico de la estirpe $\Delta F/S+S+F$ respecto a la

estirpe silvestre se potenció al incrementar la luz de crecimiento hasta $185 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo en este caso la $\text{DO}_{750\text{nm}}$ tras 24 horas un tercio de la de la estirpe silvestre (Figura 62F). En el caso de la estirpe $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}+\text{S}+\text{F}$ este aumento de luz inducía la muerte de la misma. De forma que, pese a haber suprimido el fenotipo de la estirpe $\Delta\text{F}/\text{S}$, la expresión de las enzimas de plantas no permitió un crecimiento óptimo en fotoautotofía.

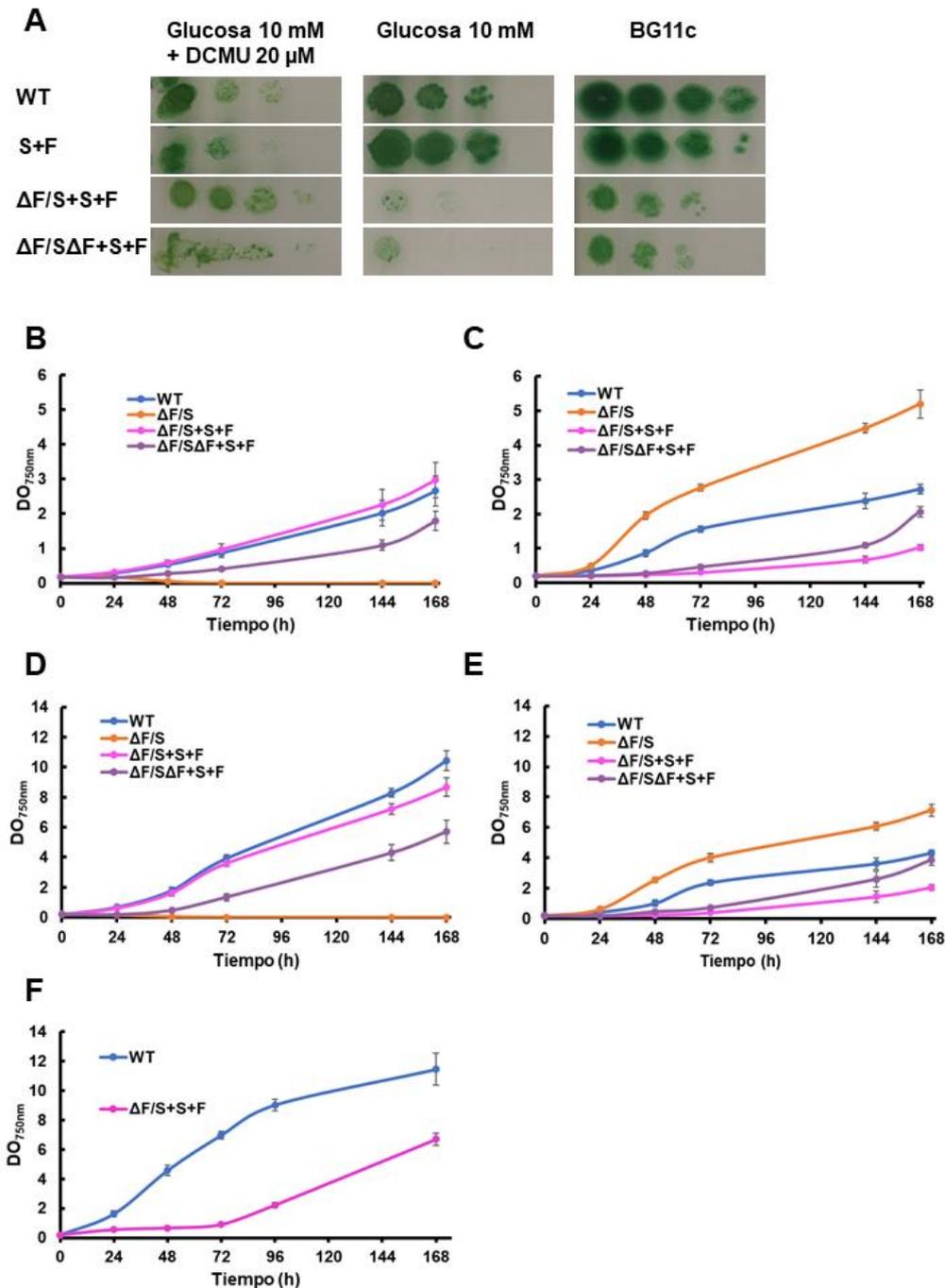


Figura 62 Determinación de la supervivencia y crecimiento en fotoautotofía, mixotofía y fotoheterotofía de las estirpes sobrepresoras de la *FBPasaPs* y *SBPasaAt*. (A) Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), S+F, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$ e $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}+\text{S}+\text{F}$ en diferentes condiciones y con una iluminación de $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los cultivos en fase exponencial en mixotofía de cada una de las estirpes se igualaron a $\text{DO}_{750\text{nm}}$ de 0,2 y se hicieron 4 diluciones 1/10 sembrándose $5 \mu\text{l}$ de cada una dejándose crecer durante 6 días. Las estirpes

$\Delta F/S+S+F$ e $\Delta F/S\Delta F+S+F$ se cultivaron durante 5 días más que el resto de las estirpes para corroborar su crecimiento en mixotrofia. **(B)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, $\Delta F/S+S+F$ e $\Delta F/S\Delta F+S+F$ cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 a $5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(C)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S\Delta F+S+F$ cultivadas en mixotrofia e iguales condiciones al apartado B. **(D)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, $\Delta F/S+S+F$ e $\Delta F/S\Delta F+S+F$ cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(E)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), $\Delta F/S$, $\Delta F/S+S+F$ e $\Delta F/S\Delta F+S+F$ cultivadas en mixotrofia e iguales condiciones al apartado D. **(F)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre) e $\Delta F/S+S+F$ cultivadas a $185 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e iguales condiciones al apartado D. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

3.3.2. Efecto de la sobreexpresión de las enzimas de plantas en fotoautotrofia.

Debido a la posibilidad de que la introducción de cualquiera de que la SBPasaAt generase cambios en el metabolismo general del carbono en condiciones fotoautotróficas, se estudió el crecimiento de las estirpes $\Delta F+S$, S, ΔF y silvestre ante diferentes intensidades de luz de crecimiento. A una intensidad de luz estándar ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) las estirpes silvestre y ΔF presentaron la misma acumulación de clorofila y velocidad de crecimiento entre ellas. Sin embargo, la estirpe S mostró un ligero retraso en el crecimiento respecto al resto de estirpes que correlacionaba con una menor acumulación de clorofila. Además, la estirpe $\Delta F+S$ presentó un ligero incremento del crecimiento respecto al resto de estirpes, y una mayor acumulación de clorofila (Figura 63A). El crecimiento del resto de estirpes solo presentó diferencias en alta luz ($550 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

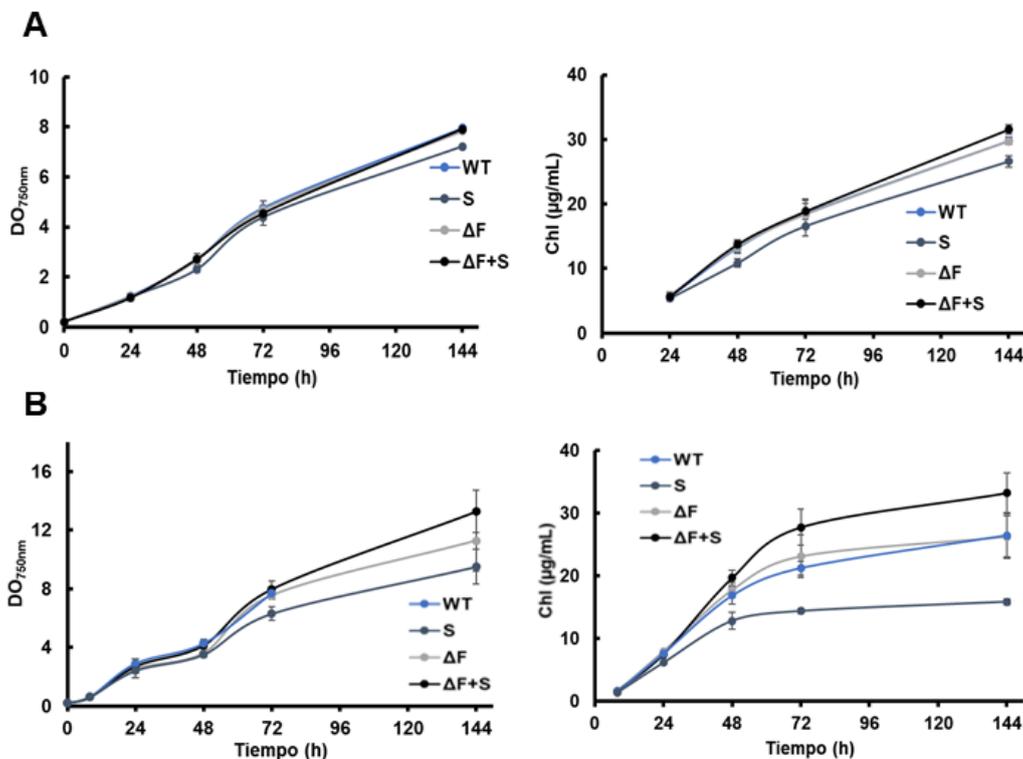


Figura 63. Crecimiento de los mutantes S y $\Delta F+S$ ante diferentes intensidades luminosas. (A) DO_{750nm} y medida de clorofila de las estirpes WT (silvestre), ΔF , S, e $\Delta F+S$ cultivadas en

BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **(B)** DO_{750nm} y medida de clorofila de las estirpes WT (silvestre), ΔF , S, e $\Delta F+S$ cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 550 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

En estas condiciones de alta luz se comprobó que las estirpes silvestre y ΔF no presentaban diferencias en cuanto a su crecimiento o acumulación de clorofila entre ellas. Esto sugería que la FBPasa de *Synechocystis* sería prescindible para un proceso fotosintético eficiente en luz continua (Figura 63B). Sin embargo, el retraso de la estirpe S se potenció (Figura 63B). En el caso de la estirpe $\Delta F+S$ el efecto fue el contrario y se potenció tanto el crecimiento como la acumulación de clorofila (Figura 63B). Por tanto, la expresión de la SBPasaAt potenció el crecimiento a baja luz y en condiciones de mixotrofia y fotoheterotrofia (Figura 60) mientras que dificultó el crecimiento en condiciones fotoautotróficas donde era necesaria la fijación de carbono. Sin embargo, en ausencia de la FBPasa el efecto obtenido fue contrario, potenciándose el crecimiento.

Para estudiar, de igual forma, el efecto de la expresión de la FBPasaPs se analizó el crecimiento de la estirpe F en alta luz (Figura 64). De forma que esta estirpe y la estirpe silvestre se cultivaron a 550 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, midiéndose su crecimiento y acumulación de clorofila. En la estirpe F, a diferencia de lo que ocurría en dichas condiciones para la estirpe S, el crecimiento aumentó en alta luz, siendo superior respecto a la estirpe silvestre. Por tanto, un aumento de la actividad FBPasa favorecía el crecimiento en alta luz, mientras que el aumento de la actividad SBPasa era negativo (Figuras 63 y 64). En estas mismas condiciones se comparó el crecimiento con la estirpe S/F, ya que el sobreexpresor de la FBP/SBPasa también presentaba un mayor crecimiento a alta luz (García-Cañas, 2016) (Figura 53). Sin embargo, en el caso de la sobreexpresión de la FBP/SBPasa el aumento en el crecimiento era mayor. Esto indica que la enzima FBP/SBPasa presenta una fina regulación coordinada de ambas actividades para aumentar la eficiencia al máximo dependiendo de las condiciones de crecimiento, algo que no se obtuvo con las enzimas cloroplastídicas.

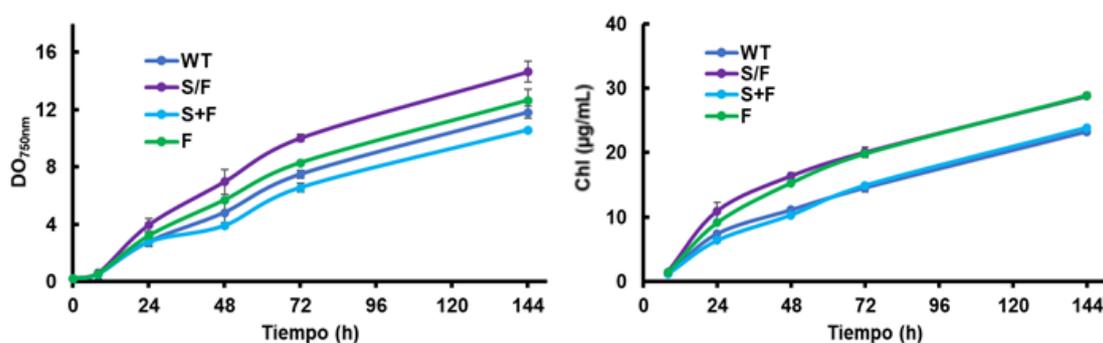


Figura 64. Crecimiento del mutantes F en alta intensidad luminosa. DO_{750nm} y medida de clorofila de las estirpes WT (silvestre), F, S/F y S+F cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los experimentos de crecimiento se realizaron con una alta intensidad luminosa, 550 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Puesto que la sobreexpresión por separado de solamente la SBPasaAt o la FBPasaPs generó un retraso y un incremento en el crecimiento respectivamente, se

procedió a analizar el efecto conjunto de la expresión de ambas a $550 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Este mutante, a diferencia de las estirpes S y F (Figuras 63 y 64), presentó una $\text{DO}_{750\text{nm}}$ y cantidad de clorofila similar a la de la estirpe silvestre en alta luz. La única diferencia entre ambas fue que la estirpe S+F presentaba un ligero retraso, aunque la cantidad de clorofila acumulada fue idéntica a la de la estirpe silvestre. Lo que sugiere que la cantidad de clorofila por unidad de densidad óptica a 750 nm sería mayor en el mutante S+F. Esta diferencia en el crecimiento con respecto al silvestre no fue, en ningún caso, comparable con el de las estirpes S y F. De forma que la expresión conjunta realmente anulaba los efectos individuales de cada enzima.

3.3.3. Cambios en la actividad FBPasa de las estirpes.

Para determinar si los problemas en cuanto al crecimiento de las estirpes $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}+\text{S}+\text{F}$ y $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$ se debían a defectos en la actividad FBPasa general, se realizaron experimentos donde se midió la actividad FBPasa *in situ* de estas dos estirpes y de estirpes que expresaban las enzimas de planta, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Puesto que la cantidad de magnesio que necesitan las enzimas de plantas para dichas condiciones de ensayo no estaba determinada se probaron diferentes concentraciones del mismo. Las estirpes analizadas crecieron en medio BG11c hasta la fase exponencial con una luz de crecimiento de $50 \mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, tras esto se siguió el método descrito en el apartado 5.1.2. de Materiales y Métodos con concentraciones crecientes de magnesio, para las estirpes silvestre, S/F, S, F, S+F, $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}+\text{S}+\text{F}$ e $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$ a las que se les añadió, o no, 10 mM de DTT como agente reductor (Figura 65). Respecto a la estirpe silvestre, para la que se había realizado este mismo experimento con una luz de crecimiento baja (Figura 44), se determinó que la actividad FBPasa en condiciones reductoras con 75 mM de magnesio era superior a una mayor luz de crecimiento mientras que en condiciones no reductoras era similar. De forma que la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa generada por la enzima FBP/SBPasa era mayor pese a que la cantidad de la misma en ambas condiciones era muy similar (Figuras 39A, 65A). Sin embargo, la actividad debida a la enzima FBPasa no se veía afectada por este cambio en la intensidad luminosa, siendo la medida igual en ambos (Figura 65B). En el caso de la estirpe S/F la actividad en condiciones reductoras fue un 21% superior a la de la estirpe silvestre con 75 mM de magnesio, aunque a todas las concentraciones de magnesio fue superior, mientras que en condiciones no reductoras es solo un 7% superior a la de la estirpe silvestre. Esto coincide con que el efecto de dicha enzima principalmente se observaba en condiciones reductoras. En el caso del mutante S este presentó una actividad en condiciones reductoras similares a las del mutante S/F, siendo la principal diferencia que a muy altas concentraciones de magnesio esta decrecía en el mutante S pero no en el S/F. Por lo que este mutante presentó un incremento de actividad, respecto a la estirpe silvestre, de un 18%. Ya que fue posible segregar el mutante $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}+\text{S}$, posiblemente esta sea la actividad FBPasa necesaria para que un doble mutante $\Delta\text{F}/\text{S}\Delta\text{F}$ pueda sobrevivir con una fuente de carbono externa (Figura 55). De forma que en dichas condiciones el mutante S, a pesar de solo haber incluido una actividad SBPasa, presenta una mayor actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa; lo que confirmó que esta enzima presenta ambas actividades (Gutle et al., 2016). En el caso de

condiciones no reductoras, también a 75 mM de magnesio, la estirpe S presentó un 23% más de actividad que la estirpe silvestre por lo que esta enzima no se encontraría totalmente oxidada. Esto puede deberse a que las proteínas de cianobacterias sean más susceptibles a la oxidación por aire (ya que en esta técnica la muestra se agita). Esto se apoyó también con los resultados de la estirpe F, que con 75 mM de Mg en condiciones no reductoras presento casi el triple de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa que la estirpe silvestre. En condiciones reductoras esta diferencia con respecto a la estirpe silvestre fue de un 37%. La estirpe S+F presentó, en condiciones reductoras, un incremento del 80% de actividad respecto a la estirpe silvestre a 75 mM de Mg y en condiciones no reductoras el incremento de actividad fue de más de 3 veces. En ambos casos, a una concentración de exceso de Mg, el incremento de actividad fue incluso superior a diferencia de en los mutantes S y F donde con un exceso de cofactor la actividad disminuyó. Por lo que la expresión de ambas enzimas en condiciones reductoras tuvo un incremento de actividad mayor al sumatorio del efecto de cada una.

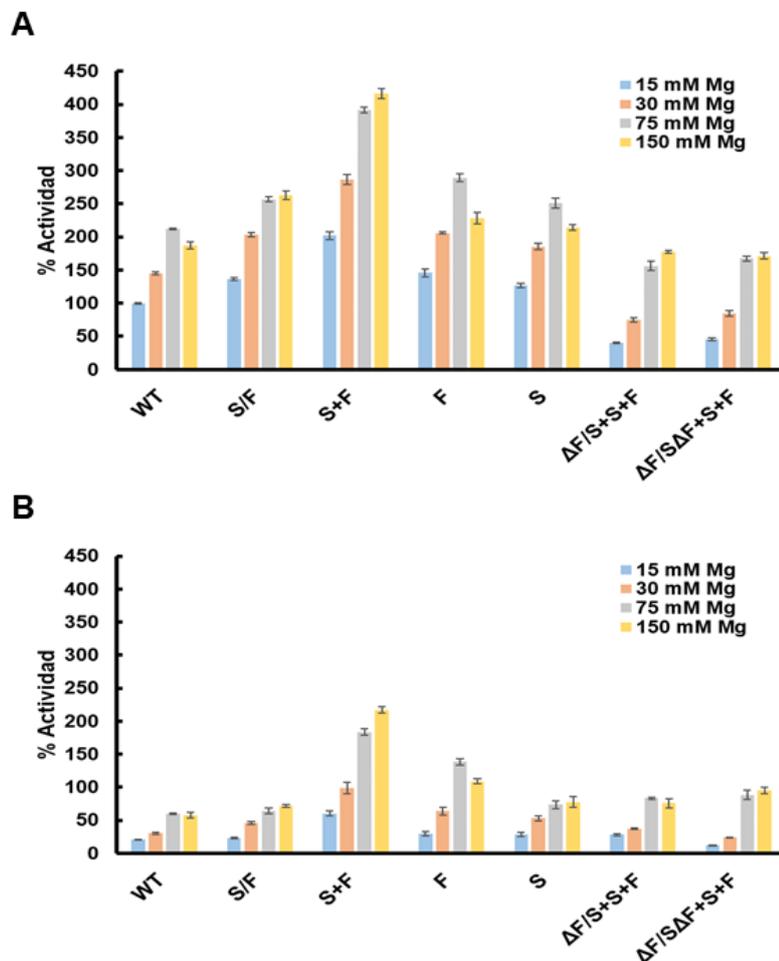


Figura 65. Medida de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en mutantes que expresan SBPasaAt y FBPasaPs. (A) Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), S/F, S+F, F, S $\Delta F/\Delta F+S+F$ e $\Delta F/S+S+F$ donde se añadieron diferentes concentraciones de magnesio al ensayo que se realizó con 10 mM de DTT. **(B)** Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), S/F, S+F, F, S $\Delta F/\Delta F+S+F$ e $\Delta F/S+S+F$ donde se añadieron diferentes concentraciones de magnesio al ensayo que se realizó sin la adición de DTT. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los experimentos se realizaron a 50 μ mol

fotones·m⁻² ·s⁻¹. Los datos se normalizaron tomando de referencia la actividad FBPasa de la estirpe WT (silvestre) con 10 mM de DTT.

Las estirpes mutantes generadas donde se recuperó el crecimiento fotoautotrófico, $\Delta F/S\Delta F+S+F$ e $\Delta F/S+S+F$, presentaron una gran disminución de la actividad FBPasa en condiciones reductoras con respecto a la estirpe silvestre a concentraciones inferiores a 75 mM de magnesio. Así, a 15 mM de magnesio la diferencia fue de un 40% con la actividad del silvestre en ambas estirpes, a 50 mM la actividad fue la mitad de la estirpe silvestre en esas mismas condiciones y a 75 mM de magnesio la actividad ascendió a un 75% de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de la estirpe silvestre. Por tanto, ambas estirpes presentaban una gran disminución de la actividad FBPasa debida a la pérdida de la FBP/SBPasa. Esto indicó que el retraso en el crecimiento de las estirpes podría deberse a que las enzimas de plantas no realizarían eficientemente estas actividades. En el caso de condiciones no reductoras, con 15 mM de magnesio la estirpe $\Delta F/S+S+F$ presentó un incremento de un 35 % de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa respecto a la estirpe silvestre. Este efecto era igual al observado en las estirpes S y F, pero inferior al de la estirpe S+F. La diferencia en la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa respecto a la estirpe silvestre se mantuvo en todas las concentraciones superiores de Mg. Sin embargo, la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S+F$ que además carecía de la enzima FBPasa, presentó una disminución de un 60% y 75% a 15 y 30 mM de magnesio; esta estirpe únicamente superó la actividad de la enzima silvestre a altas concentraciones de Mg donde su actividad se equiparó a la de la estirpe $\Delta F/S+S+F$. Por lo que, en condiciones no reductoras y a concentraciones bajas de magnesio, la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de las enzimas de plantas era inferior a la de *Synechocystis*.

3.4. Cambios en la eficiencia de las proteínas cloroplastídicas por la presencia de la tiorredoxina *f1* de *Arabidopsis thaliana*.

En plantas las principales tiorredoxina implicadas en la regulación de las enzimas FBPasa y SBPasa cloroplastídicas son las tiorredoxinas *f* (Yoshida et al., 2015; Gutle et al., 2016; Fernández-Trijueque et al., 2019). Sin embargo, *Synechocystis* carece de una tiorredoxina tipo *f*, a diferencia de plantas (Florencio et al., 2006), por tanto las diferencias en el crecimiento fotoautotrófico dependientes de luz de las estirpes $\Delta F/S\Delta F+S+F$ y $\Delta F/S+S+F$ podrían deberse a una incorrecta regulación dependiente de luz de dichas enzimas. De forma que es posible que el sistema reductor de tiorredoxinas y glutarredoxinas de *Synechocystis* no pueda activar eficientemente por reducción a las proteínas de plantas. Puesto que en las proteínas de cianobacteria el grado de reducción aumenta al aumentar la intensidad de la luz de crecimiento (Figuras 55, 56), es posible que esto no ocurra tan eficientemente en las proteínas de plantas introducidas. Para comprobar si el menor crecimiento se debía a una menor reducción ante la falta de tiorredoxinas *f* en *Synechocystis* esto se introdujo la tiorredoxina *f1* de *A. thaliana* en la estirpe $\Delta F/S+S+F$.

3.4.1. Generación de la estirpe sobreexpresora de Trx *f1*.

Para la generación de una estirpe que expresara de forma constitutiva Trx *f1* se transformaron las estirpes silvestre y S+F con el plásmido

plat_arsB_PcpcB_trxF1_Sp, generándose así las estirpes TrxF y S+F+TrxF. En estas la secuencia codificante para la proteína de *A. thaliana* Trx f1 (TrxF1) quedó bajo el promotor constitutivo de *cpcB* (Figura 66), insertado en el operón *arsBHC*. Posteriormente la estirpe S+F+TrxF se transformó con el plásmido pslr2094_Ery (García-Cañas, 2015) para generar la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$. La segregación de ambas transformaciones se comprobó mediante PCR (Figura 66B y 66C), además la acumulación de las proteínas se determinó mediante Western Blot (Figura 66D, 66E).

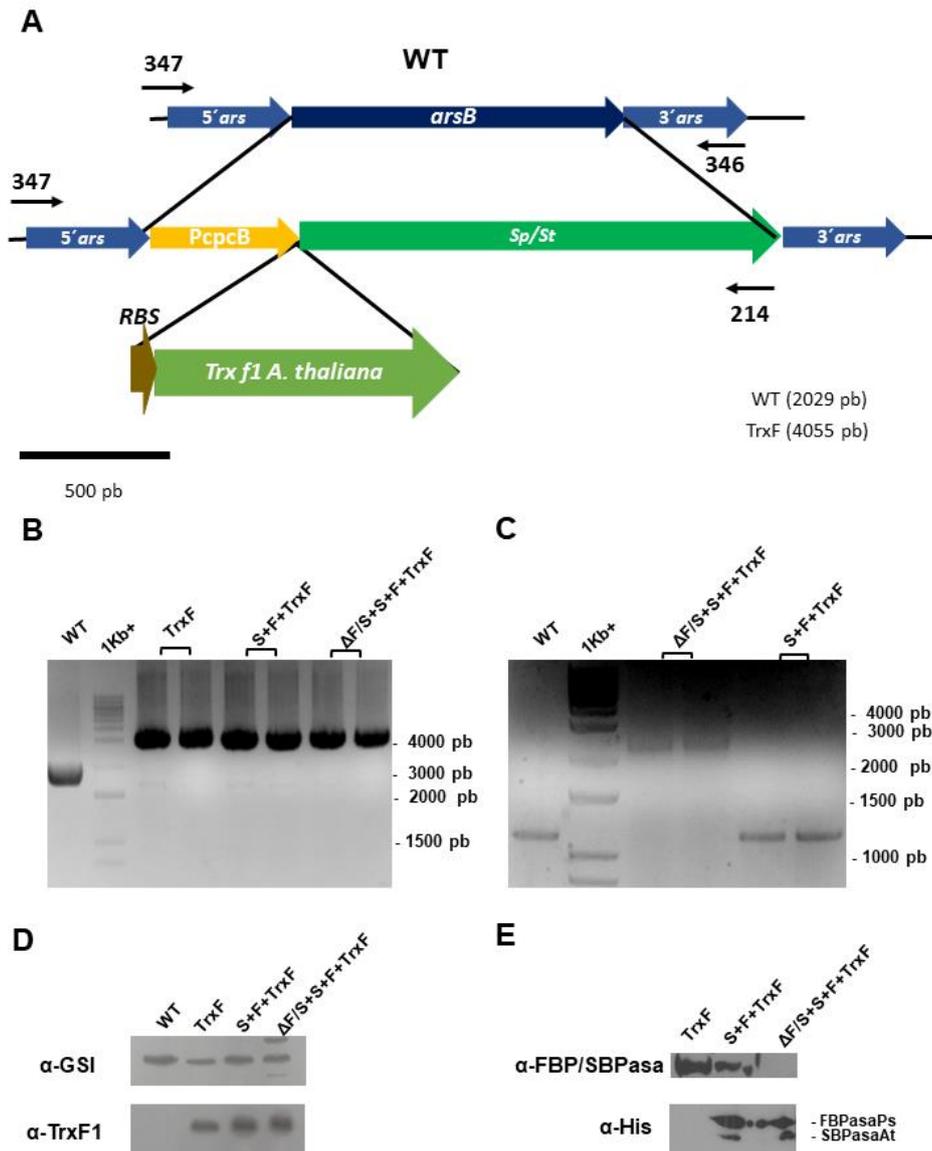


Figura 66. Construcción de las estirpes que expresaban la tiorredoxina f1 de *A. thaliana*. (A) Representación esquemática de la de la región génica del operón *ars* en los mutantes sobreexpresores de la TrxF1 de *A. thaliana* y la estirpe WT (silvestre). El gen introducido presenta la secuencia codificante para una cola de histidinas, que se expresó bajo un promotor constitutivo con un sitio de unión al ribosoma (RBS) de *E. coli*. (B) Análisis por PCR de la segregación de la región génica del operón *ars* en las estirpes TrxF, S+F+TrxF y $\Delta F/S+S+F+TrxF$ empleando los oligonucleótidos 346, 214 y 347. (C) Análisis por PCR de la segregación de la mutación *slr2094::Ery* en la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ usando los oligonucleótidos 143 y 164. (D) Western Blot de GSI y tiorredoxina f1 de *Arabidopsis thaliana* en las estirpes WT (silvestre), TrxF, S+F+TrxF y $\Delta F/S+S+F+TrxF$ cultivadas en BG11c y burbujeado con aire enriquecido con 1%

(vol/vol) de CO₂ a 50 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹. Se cargaron 10 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE. **(E)** Western Blot de la FBP/SBPasa y de las proteínas con colas de histidina en las estirpes TrxF, S+F+TrxF y ΔF/S+S+F+TrxF cultivadas en BG11c y burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂ a 50 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹. Se cargaron 10 μg para el anticuerpo frente a la FBP/SBPasa y 350 μg totales de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 10% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

3.4.2. Efectos en el crecimiento y en la capacidad fotosintética.

Con el fin de determinar si la expresión de TrxF1 suponía una mejora para la estirpe ΔF/S+S+F+TrxF respecto a su parental se analizó el crecimiento de ambas a diferentes intensidades luminosas (Figura 67). Ya que el crecimiento de las estirpes ΔF/S+S+F y silvestre fue similar a baja luz, cuando los requerimientos fotosintéticos eran bajos, se analizó el crecimiento de las estirpes ΔF/S+S+F+TrxF, ΔF/S+S+F, TrxF y silvestre a mayores intensidades luminosas. Para esto las estirpes ΔF/S+S+F+TrxF, ΔF/S+S+F, TrxF y silvestre se cultivaron a 50 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹ (Figura 67A) y 185 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹ (Figura 67B). Tanto cuando las estirpes crecieron a una luz de crecimiento estándar como a alta luz, la sola expresión de TrxF1 no afectó al crecimiento (Figura 67) pues las estirpes TrxF y silvestre presentaron un patrón idéntico de crecimiento en ambas condiciones. Por lo que, aun si esta tiorredoxina afectase al estado redox de proteínas de *Synechocystis*, esto no se reflejó en el crecimiento. Sin embargo, la expresión de TrxF1 en un mutante que presentaba la FBPasaPs y SBPasaAt y a su vez carecía de la enzima FBP/SBPasa de cianobacteria (mutante ΔF/S+S+F+TrxF) supuso una diferencia con respecto a la no expresión de este regulador redox, tanto a luz de crecimiento estándar como a alta luz (Figura 67). Así, el mutante ΔF/S+S+F+TrxF no presentó un retraso en el crecimiento con respecto a la estirpe silvestre algo que sí ocurría en la estirpe ΔF/S+S+F, a una luz de crecimiento estándar. En cuanto a alta luz, la estirpe ΔF/S+S+F presentó un gran retraso respecto a la estirpe silvestre y la estirpe ΔF/S+S+F+TrxF presentó solamente un ligero retraso. Estos resultados señalaban que la expresión de TrxF1 producía una mejora en el fenotipo de la estirpe ΔF/S+S+F. Por lo que esta tiorredoxina posiblemente era capaz de reducir las enzimas de planta haciendo que fueran más eficientes.

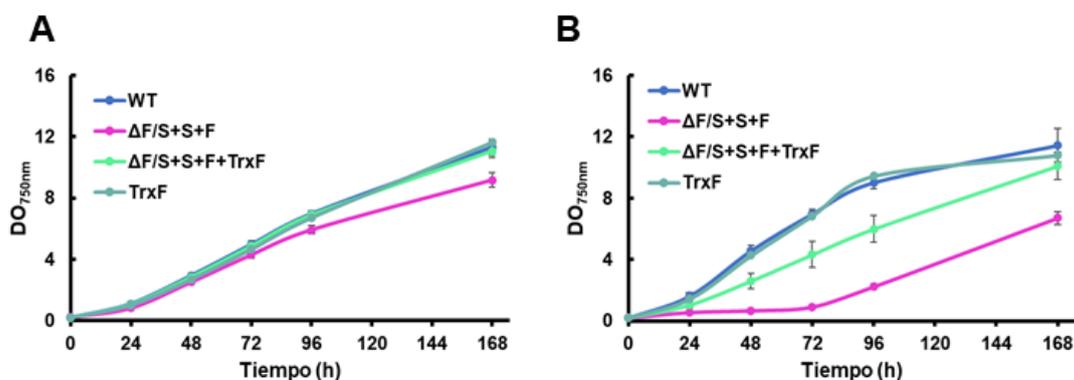


Figura 67. Crecimiento a diferentes intensidades luminosas de la estirpe ΔF/S+S+F+TrxF. **(A)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), TrxF, ΔF/S+S+F y ΔF/S+S+F+TrxF cultivadas a 50 μmol fotones·m⁻²·s⁻¹ en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO₂. **(B)** Crecimiento de las estirpes WT (silvestre), TrxF, ΔF/S+S+F e ΔF/S+S+F+TrxF cultivadas a 185

$\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos.

Para comprobar si este cambio en el crecimiento se debió a una mejora en la capacidad fotosintética, se estudió la evolución de oxígeno de las estirpes silvestre, $\Delta\text{F/S+S+F+TrxF}$, $\Delta\text{F/S+S+F}$, $\Delta\text{F/S}\Delta\text{F+S+F}$ y TrxF mediante el uso de un electrodo de oxígeno tipo Clark. Por tanto, se realizaron curvas de saturación a intensidades luminosas crecientes (Figura 68A). Para que todas las estirpes crecieran a una tasa similar estas se cultivaron en baja luz hasta alcanzar su fase exponencial, momento en el cual se midió el desprendimiento de oxígeno a diferentes intensidades de luz. Pese a que todas las estirpes saturaron a la misma intensidad de luz, la ratio de evolución de oxígeno varió. Mientras que la estirpe silvestre y TrxF presentaron valores muy similares ($17,3\pm 1,3 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $17\pm 1,5 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ respectivamente) la de la estirpe $\Delta\text{F/S+S+F+TrxF}$ fue ligeramente inferior ($15,3\pm 0,7 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$). En todo caso, la cantidad de oxígeno desprendida por la estirpe $\Delta\text{F/S+S+F+TrxF}$ fue superior a la de las estirpes $\Delta\text{F/S+S+F}$ y $\Delta\text{F/S}\Delta\text{F+S+F}$ ($13,8\pm 0,2 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ y $12,2\pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1}/\text{DO}_{750\text{nm}}$ respectivamente); estando la de la estirpe $\Delta\text{F/S+S+F}$ ligeramente por encima de la estirpe $\Delta\text{F/S}\Delta\text{F+S+F}$. Estos resultados coincidían con los anteriores sobre el crecimiento de los mutantes (Figuras 62 y 67). Los resultados de desprendimiento de oxígeno, por tanto, señalaron que la sola expresión de TrxF1 no parecía generar ningún cambio a nivel fotosintético, pero en el mutante $\Delta\text{F/S+S+F+TrxF}$ sí que supuso una mejora, recuperando el fenotipo silvestre. Además, señaló que el menor crecimiento de las estirpes $\Delta\text{F/S+S+F}$ e $\Delta\text{F/S}\Delta\text{F+S+F}$ probablemente se debía a una disminución en la capacidad fotosintética, así como en la actividad FBPasa (Figuras 62 y 65).

Además, se determinó la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa *in situ* de cultivos de estas estirpes (Figura 68). El experimento se realizó con concentraciones crecientes de magnesio, ya que se había demostrado anteriormente que especialmente las enzimas cloroplásticas necesitaban cantidades altas de este. A alta luz la actividad en condiciones reductoras de la estirpe silvestre disminuyó levemente con respecto la actividad a luz estándar, probablemente debido a la leve disminución de la enzima FBP/SBPasa en alta luz (Figuras 39 y 68). Esto mismo ocurrió en la estirpe TrxF, que siempre presentó la misma actividad que la estirpe silvestre. En ambas estirpes la actividad en condiciones no reductoras no se alteró ante diferentes intensidades luminosas, lo que coincidió con que los niveles de FBPasa no se veían alteradas dependiendo de esto en la estirpe silvestre (Figura 39). Por tanto, esto apoya el hecho de que la tiorredoxina no influya sobre las FBPasas de *Synechocystis* o que la cianobacteria cuenta con otros mecanismos para mantener a estas proteínas en el estado de oxidación adecuado.

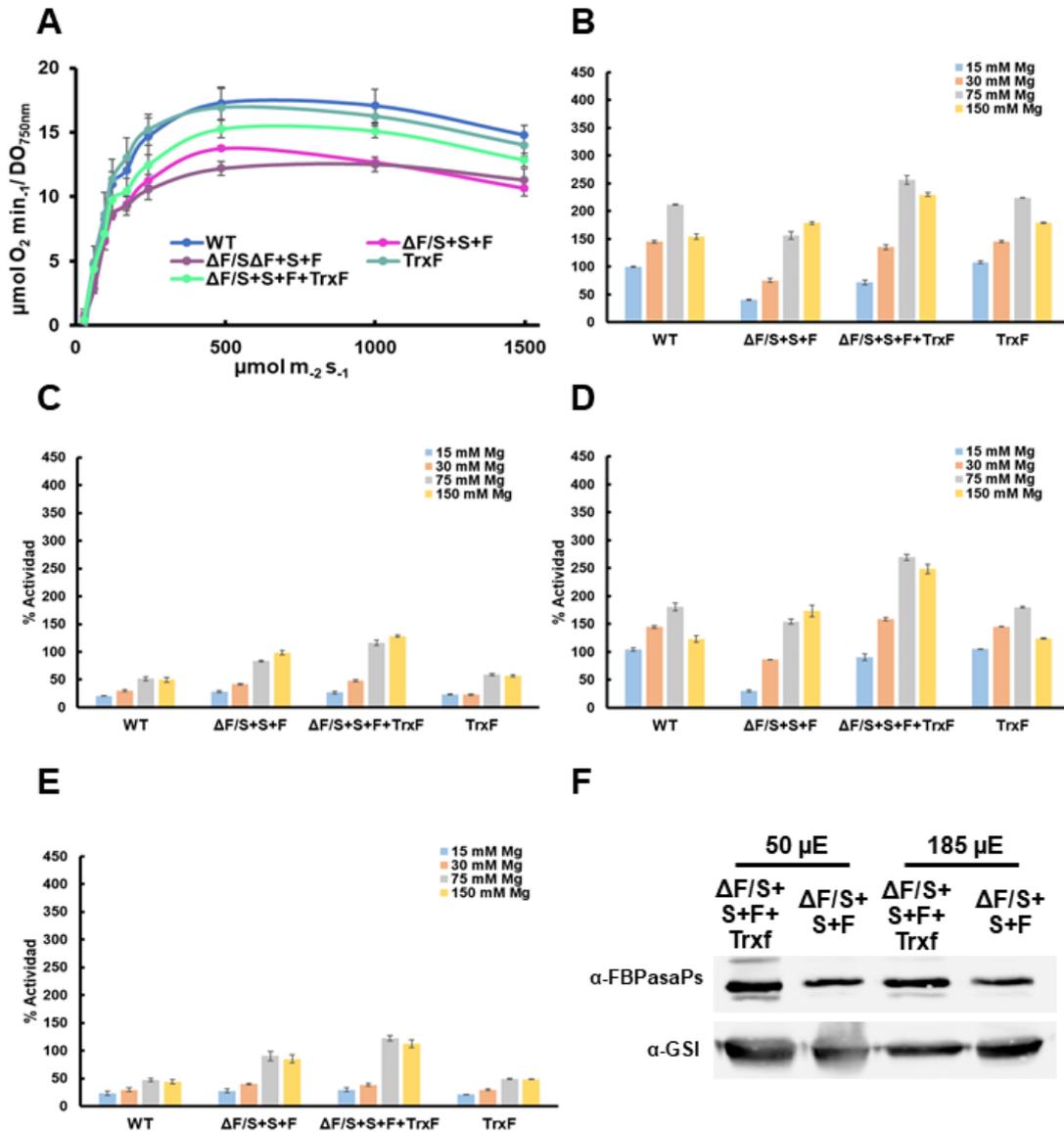


Figura 68. Análisis de la actividad FBPasa y de la evolución de oxígeno de la estirpe $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ dependiendo de la intensidad luminosa. (A) Evolución de oxígeno de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\Delta\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ y TrxF medida con un electrodo de Clark a intensidades luminosas crecientes en cultivos que se encontraban en fase exponencial ($\text{DO}_{750}=0,5-1$) tras 24 horas de crecimiento en medio BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 . **(B)** Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ y TrxF donde se añadieron diferentes concentraciones de magnesio al ensayo que se realizó con la adición de 10 mM de DTT. Las estirpes crecieron a 50 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Las medidas están normalizadas a la de la estirpe WT (silvestre) cultivada a 50 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ tras la adición de 15 mM de magnesio que corresponde al 100% de actividad. **(C)** Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ y TrxF donde se añadieron diferentes concentraciones de magnesio al ensayo que se realizó sin la adición de DTT. La normalización y condiciones de cultivo son iguales al apartado B **(D)** Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ y TrxF cultivadas a 185 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El resto de las condiciones fueron iguales a las del apartado B. **(E)** Medida de actividad FBPasa *in situ* de las estirpes WT (silvestre), $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}$, $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ y TrxF cultivadas a 185 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El resto de las condiciones fueron iguales a las del apartado C. **(F)** Western Blot de FBPasePs y GSI en las estirpes $\Delta\text{F}/\Delta\text{S}+\text{S}+\text{F}$ y $\Delta\text{F}/\text{S}+\text{S}+\text{F}+\text{TrxF}$ cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 a 50 o 185 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Se cargaron 15 μg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 12% mediante

electroforesis SDS-PAGE. Los resultados representan la media de, al menos, tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

La estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ a 15 mM de magnesio en condiciones reductoras presentaba una actividad del 70% respecto a la estirpe silvestre a luz estándar, mientras que a alta luz es del 85%. Esto supone una mejora de un 30% y 60% respecto a la actividad de $\Delta F/S+S+F$ en dichas condiciones. La actividad de las estirpes $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S+S+F+TrxF$ en condiciones no reductoras, sin embargo, fue independiente de luz y, en todas las concentraciones de magnesio estudiada, fue mayor que la de la estirpe silvestre. De forma que fue 2 ($\Delta F/S+S+F$) y 2,5 ($\Delta F/S+S+F+TrxF$) veces mayor que en la estirpe silvestre en condiciones no reductoras con una concentración de 75 mM del cofactor. En el caso de la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ la actividad FBPasa con 75 mM de magnesio fue un 20% superior a la de la estirpe silvestre en condiciones de luz estándar y un 50% superior a la de la estirpe silvestre en condiciones de alta luz. Puesto que a baja concentración de magnesio la actividad, en ambos casos, de la estirpe silvestre fue superior la actividad FBPasa de las enzimas cloroplastídicas presenta una mayor dependencia a magnesio. Además, la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ presenta una mayor cantidad de FBPasaPs en ambas intensidades luminosas que la estirpe $\Delta F/S+S+F$ (Figura 68F), lo que señala que la expresión de TrxF1 de alguna forma incrementa la expresión de esta proteína o estabiliza la proteína sintetizada (Sanz-Barrio et al., 2012; Du et al., 2015).

3.4.3. Efectos redox en las proteínas cloroplastídicas.

Puesto que la introducción de TrxF1 mejoró el fenotipo de la estirpe $\Delta F/S+S+F$ se comprobó si el sistema redox de *Synechocystis* era capaz de alterar el estado de la FBPasaPs. Es decir, si el problema de esta estirpe se debía a que el sistema no era lo suficientemente eficiente o que no era capaz de actuar sobre las proteínas exógenas. Para esto se analizó el estado de oxidación/reducción de la FBPasaPs en la estirpe $\Delta F/S+S+F$ en respuesta a 24 horas de luz ($50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) u oscuridad (Figura 69A). El marcaje de las cisteínas originalmente reducidas se realizó con NEM, tras lo cual las proteínas del extracto se redujeron para marcar las cisteínas con MM(PEG24); marcando así estas las cisteínas inicialmente oxidadas. La FBPasa cloroplastídica y su estado redox en diferentes condiciones tras el marcaje se visualizó mediante Western Blot. Como control de las bandas inespecíficas del anticuerpo se usó la estirpe silvestre. Para esta proteína la sola adición de NEM supuso un cambio lo suficientemente alto en el peso molecular como para diferenciar la enzima oxidada de la enzima reducida (Figura 69). Por tanto, el paso de un estado oxidado a reducido en la FBPasaPs se realizó debido a la reducción de varias cisteínas existiendo principalmente dos poblaciones mayoritarias.

Para estudiar esto los cultivos crecieron hasta la fase exponencial en luz estándar de crecimiento y posteriormente se mantuvieron 24 horas en oscuridad o en luz de crecimiento estándar. Con esto se demostró que en la estirpe $\Delta F/S+S+F$ el estado de oxidación de FBPasaPs se veía alterado con los ciclos de luz (L) y oscuridad (O), por lo que el mecanismo de regulación redox de cianobacteria era capaz de reducir

a esta enzima. Al calcular su porcentaje de reducción (mediante la cantidad de proteína oxidada y reducida diferenciada mediante la adición de NEM) se determinó que, en condiciones de oscuridad esta estirpe presentaba una reducción del 29% de la proteína con respecto a la misma medida en condiciones de luz de crecimiento estándar (Figura 69A, 69E). Sin embargo, cuando este mismo experimento de marcaje se realizó en la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ se determinó que, aunque el grado de oxidación en oscuridad de la proteína era similar al de la estirpe $\Delta F/S+S+F$, en luz variaba (Figura 69B, 69E). La estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ presentaba un grado de reducción un 15% superior al de la estirpe $\Delta F/S+S+F$. De forma que, posiblemente, sería esta leve diferencia en el estado de reducción de esta proteína y su posible efecto en la SBPasaAt las causas de la diferencia en el crecimiento de ambas estirpes (Figura 67A) y la variación en sus parámetros fotosintéticos (Figura 68A).

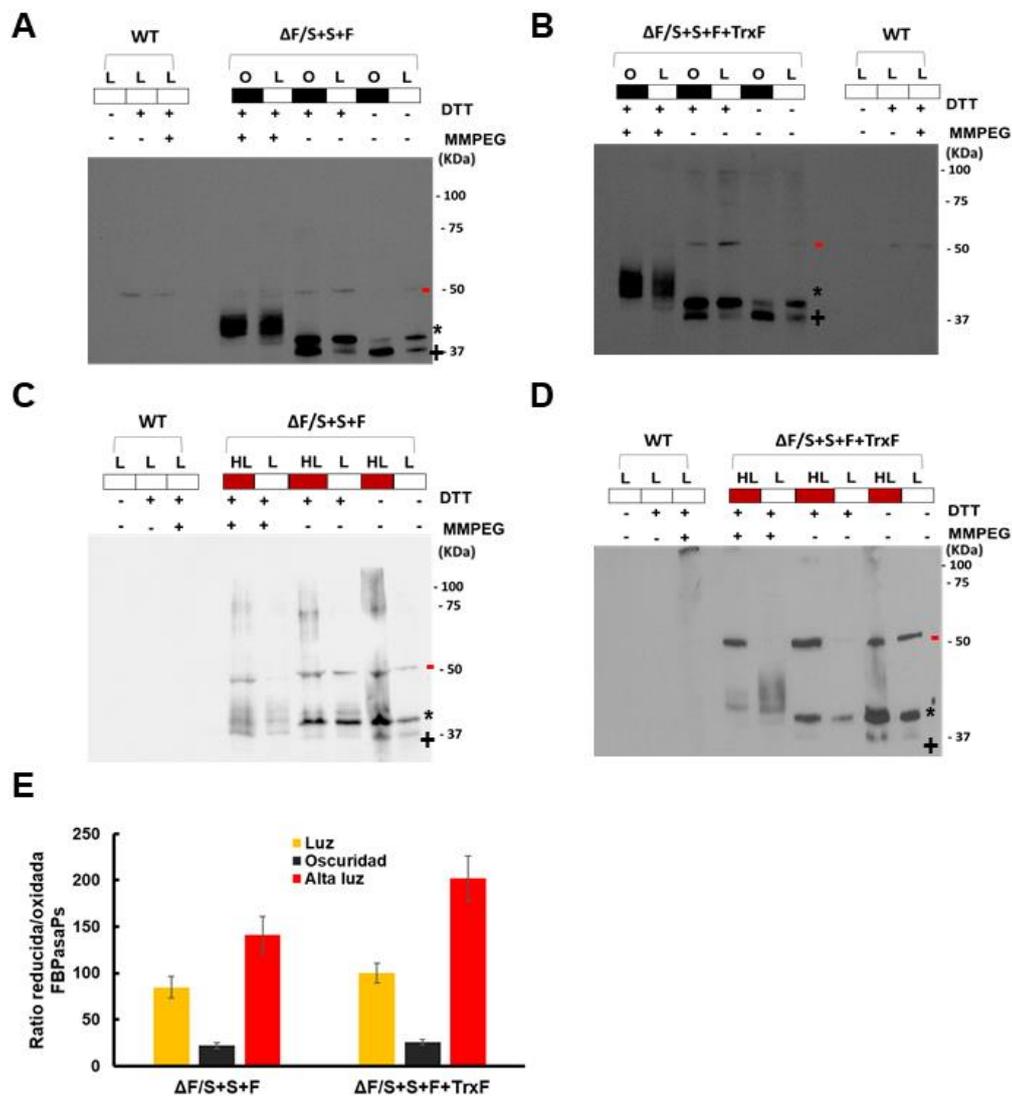


Figura 69. Análisis del estado redox de la FBPasa cloroplastídica dependiente de luz de la presencia de TrxF1. (A) Western Blot de FBPasePs en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta F/S+S+F$, cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en oscuridad (O) o a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (L). A las células se les añadió NEM (10 mM) y en dichas condiciones se extrajeron las proteínas. Tras esto se siguió el protocolo descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos. Se cargaron 20 μg de proteína total de los extractos y estas se separaron con un gel al 10% mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones no

reductoras. Posteriormente se analizó por Western Blot la cantidad de proteína. **(B)** Western Blot de FBPasaPs en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta S/F+S+F+TrxF$. Las condiciones de cultivo y el tratamiento de las células fue igual al de apartado A. **(C)** Western Blot de FBPasaPs en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta S/F+S+F$, cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en $185 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (HL) o a $50 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (L). El tratamiento de las células fue igual al de apartado A. **(D)** Western Blot de FBPasaPs en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta S/F+S+F+TrxF$. Las condiciones de cultivo y el tratamiento de las células fue igual al de apartado C. **(E)** Cuantificación de la ratio de FBPasaPs reducida/oxidada en las estirpes $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S+S+F+TrxF$ cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 y mantenidas durante 24 horas en oscuridad, $50 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (μE) o $185 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (μE). El 100% de actividad corresponde a la ratio de la estirpe $\Delta S/F+S+F+TrxF$ en luz. Los resultados son representativos o provienen de, al menos, tres repeticiones biológicas independientes con los mismos resultados. Las barras de error corresponden al error estándar de los mismos. El signo * hace referencia al estado reducido, el signo + al estado oxidado y el signo - a las bandas inespecíficas de cada anticuerpo. El anticuerpo empleado en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Puesto que la mayor diferencia en el crecimiento entre las estirpes se observó a alta luz (Figura 67) se realizó este mismo experimento para estirpes que, tras llegar a su fase exponencial, crecieron durante 24 horas en $185 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ o alta luz (HL) o luz estándar de crecimiento ($50 \mu mol \text{ fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) (L) (Figura 69C, 69D). De esta forma se determinó que, en alta luz el estado de reducción de la enzima era mayor para ambas estirpes. Esta reducción fue un 20% mayor para la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$. Por lo que, la reducción es mayor con la principal tiorredoxina que actúa sobre la enzima en planta. Aun así las tiorredoxinas de cianobacteria, pese a no ser tipo *f*, deben ser capaz de actuar sobre la FBPasa cloroplastídica ya que en la estirpe $\Delta F/S+S+F$ el porcentaje de FBPasaPs reducida aumenta en luz (Figura 69).

De igual forma, esta tiorredoxina *f* de planta debe ser capaz de tomar el poder reductor generado en la fotosíntesis como las tiorredoxinas endógenas de *Synechocystis*. Para determinar si Trx *f1* en la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ es capaz de oxidarse y reducirse al cambiar las condiciones ambientales se analizó mediante Western Blot el estado redox de la misma. Empleando las mismas muestras y el mismo diseño que para el experimento anterior, se determinó que Trx *f1* presentaba un mayor grado de oxidación en oscuridad respecto a la estirpe que había crecido durante 24 horas a una intensidad de luz estándar (Figura 70A). Del mismo modo, ante una mayor luz de crecimiento el grado de reducción de la proteína aumentó (Figura 70B). Esto apoyaba, por tanto, que dicha proteína era la culpable de la mayor reducción de la FBPasaPs en el mutante $\Delta F/S+S+F+TrxF$ (Figura 69). También ratificaba que el sistema donador de electrones hacia las tiorredoxinas de *Synechocystis* era capaz de donar estos electrones a la tiorredoxina de planta.

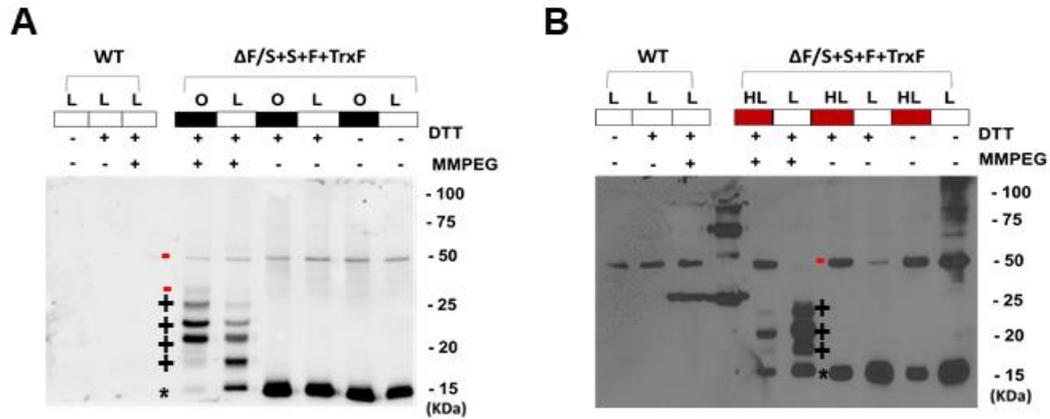


Figura 70. Análisis de la reducción de TrxF1 en la estirpe $\Delta S/F+S+F+TrxF$ dependiente de la intensidad luminosa. (A) Western Blot de TrxF1 en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta S/F+S+F+TrxF$, cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (L) u oscuridad (O). A las células se les añadió NEM (10 mM) y en dichas condiciones se extrajeron las proteínas. Tras esto se siguió el protocolo descrito en el punto 3.8. de Materiales y Métodos. Se cargaron $20 \mu\text{g}$ de proteína total de los extractos y estas se separaron con un gel al 12% mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Posteriormente se analizó por Western Blot la cantidad de proteína. (B) Western Blot de TrxF1 en las estirpes WT (silvestre) y $\Delta S/F+S+F+TrxF$, cultivadas en BG11c burbujeado con aire enriquecido con 1% (vol/vol) de CO_2 durante 24 horas en $185 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL) o a $50 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (L). El tratamiento realizado a las células fue idéntico al del apartado A. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. El signo * hace referencia al estado reducido, el signo + al estado oxidado y el signo - a las bandas inespecíficas de cada anticuerpo. El anticuerpo empleado en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Discusión

I. Regulación del intercambio Citocromo c_6 – Plastocianina.

Debido al Gran Evento de Oxigenación (GEO), hace entre 2400 y 2300 millones de años, que ocurrió gracias a la fotosíntesis realizada por cianobacterias las condiciones atmosféricas de la Tierra primitiva cambiaron (Schirrmeyer et al., 2013; Fischer et al., 2016a; Alcott et al., 2019; Sánchez-Baracaldo y Cardona, 2020). Estos cambios fueron debidos a la presencia de oxígeno, compuesto tóxico para la mayoría de organismos existentes en esa época, que generó una extinción masiva así como la necesidad de las especies de adaptarse a la presencia del mismo (Fischer et al., 2016b; Hamilton, 2019). Uno de los cambios generados por la atmósfera oxidante fue, entre otros, una disminución en la disponibilidad de hierro, metal que al oxidarse y cambiar su estado de Fe^{2+} a Fe^{3+} precipita, que anteriormente constituía el principal cofactor de estos organismos (Crichton y Pierre, 2001; Ilbert y Bonnefoy, 2013). Puesto que muchos componentes fotosintéticos contienen hierro (ambos fotosistemas, el complejo citocromo b_6f , el citocromo c_6 y las ferredoxinas) la cantidad necesaria de este metal para los organismos fotosintéticos es incluso mayor que en el resto de los organismos (Morrissey y Bowler, 2012). De forma que, para adaptarse a la limitación de este nutriente generada por el oxígeno atmosférico, los organismos fotosintéticos han desarrollado algunas proteínas alternativas a aquellas que emplean el hierro como cofactor. Una de estas proteínas es la plastocianina, una cuproproteína que reemplaza al citocromo c_6 en algunas algas y muchas cianobacterias dependiendo de la disponibilidad de hierro y cobre (Sandmann y Böger, 1980; Finazzi et al., 2005), lo que reduce considerablemente la cantidad de hierro necesaria al usar cobre (componente con mayor biodisponibilidad en una atmósfera oxidante). A diferencia de las cianobacterias, las plantas solo cuentan con la plastocianina como transportador electrónico fotosintético (Weigel et al., 2003). El hecho de que ambos transportadores estén presentes en clados cianobacterianos muy antiguos como son *Gloeobacter* o *Pseudoanabaena* sugiere que este proceso de adaptación ocurrió muy pronto en la historia evolutiva (Figura 11) de las cianobacterias. Por tanto, esta necesidad de disminuir el uso de hierro ante los cambios ambientales probablemente fue uno de los principales problemas de los organismos existentes en ese periodo. Antes de la realización de esta tesis no se conocía el mecanismo de regulación de la expresión de Cit c_6 y Pc dependiendo de las condiciones nutricionales en cianobacteria (Sandmann, 1986; Zhang et al., 1992). En algas verdes, como en el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, existe un regulador transcripcional denominado CRR1 que promueve la expresión del citocromo c_6 cuando la concentración de cobre es baja. Esta proteína es capaz de unir cobre en sus dos estados de oxidación y esta unión hace que se inhiba la síntesis del citocromo (Kropat et al., 2015). Sin embargo, este mecanismo de regulación no se encuentra conservado en las cianobacterias.

1. Control de la expresión *petJ/petE* mediado por *PetR/PetP*.

Durante la realización de esta tesis se ha determinado que el principal mecanismo de regulación del intercambio *petE/petJ* es el sistema *PetRP*. A excepción de algunos clados, todos los genomas de aquellas cianobacterias que codificaban ambos transportadores también presentaban los genes *petRP*. Incluso en algunas

de estas cianobacterias ambos genes se encontraban próximos a los de los transportadores electrónicos. Este sistema, así como *petE*, está presente en cianobacterias más primitivas evolutivamente como *Gloeobacter*, por lo que probablemente este mecanismo de regulación fuera una adaptación que surgió poco tiempo después de la adquisición de la plastocianina. Algo que coincide con que en aquellos organismos que carecen de *petE* también está ausente *petRP* (Figura 11). Este sistema de regulación no está presente en los clados *Synechococcus* y *Prochlorococcus* que sí que presentan el gen que codifica para la plastocianina. Por tanto, estas cianobacterias debían contar con dicho sistema pero probablemente lo perdieran como ha ocurrido con otros sistemas regulatorios en respuesta a diferentes cambios ambientales (Lambrecht et al., 2020).

El estudio del operón *petRP* ha determinado que PetR actúa como un regulador transcripcional induciendo la expresión de *petJ* y regulando negativamente la expresión de *petE* (Figuras 15, 21 y 22). Este regulador, homólogo de CopY, Blal y Mecl (Lewis y Dyke, 2000; Safo et al., 2005; Solioz et al., 2010; Pence et al., 2015), presenta una expresión constitutiva a pesar de que la cantidad de proteína es dependiente de cobre (Figuras 14 y 71). La relación entre el cobre y PetR se establece, por tanto, mediante PetP. PetP forma parte de la misma unidad transcripcional que PetR y es una proteína homóloga a las proteasas de membrana BlaR1 y MecR1 (Carretto et al., 2002; Llarrull et al., 2011). Esta proteasa es capaz de detectar el cobre y al interactuar con el mismo ejerce su actividad proteasa sobre PetR, produciendo su degradación (Figuras 18 y 26). Ya que la expresión de ambos componentes del sistema es independiente de cobre, no presentan un mecanismo de regulación de su expresión génica dependiendo de las condiciones ambientales (Figura 71). De forma que la única relación de ambas proteínas con el cobre se establece mediante la capacidad de PetP de detectarlo.

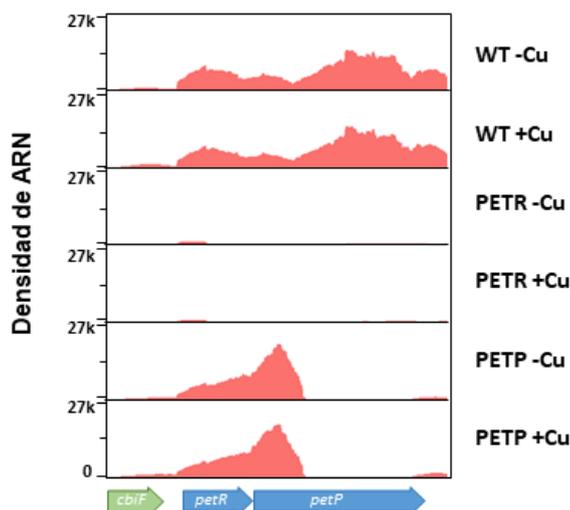


Figura 71. Análisis de la expresión de *petRP* en respuesta a cobre. Lecturas de *petRP* detectadas en el RNA-seq de las estirpes WT (silvestre), PETR y PETP previa y posteriormente a la adición de 500 nM de Cu. Los resultados provienen de tres experimentos independientes.

Puesto que ambos genes forman una única unidad transcripcional, la generación del mutante PETR disminuye la expresión de *petP* (Figura 71). Sin embargo, se ha comprobado que la cantidad de proteasa presente en PETR es suficiente para

producir la degradación de PetR (Figura 72). Además, el extracto de PETER es capaz de degradar PetR-GST ante la presencia de cobre, demostrando que en este mutante hay una cantidad suficiente de PetP funcional (Figura 26A). Las estirpes PETER2 y PETER3 se generaron con la transformación del mutante PETER con los plásmidos *pglnN::petR_petR* y *pglnN::PcpcB_rbs_petR* respectivamente, por tanto la expresión de *petP* en ellas era igual a la de la estirpe PETER (Figura 71), pero contaban con otra copia de *petR* bajo su propio promotor y bajo un promotor constitutivo fuerte. Ya que la velocidad de la degradación de PetR es menor que la de la estirpe silvestre en las estirpes PETER2 y PETER3 pero aun así es susceptible de degradación en respuesta a cobre, la disminución en la expresión de *petP* permite una acumulación de PetP suficiente para degradar a PetR eficientemente. Por tanto, la cantidad de PetP en la estirpe silvestre es, posiblemente, un exceso del mismo para permitir una rápida respuesta ante cantidades pequeñas de cobre. Por tanto, las características de este mutante no se deben a la ausencia de PetP, sino de PetR.

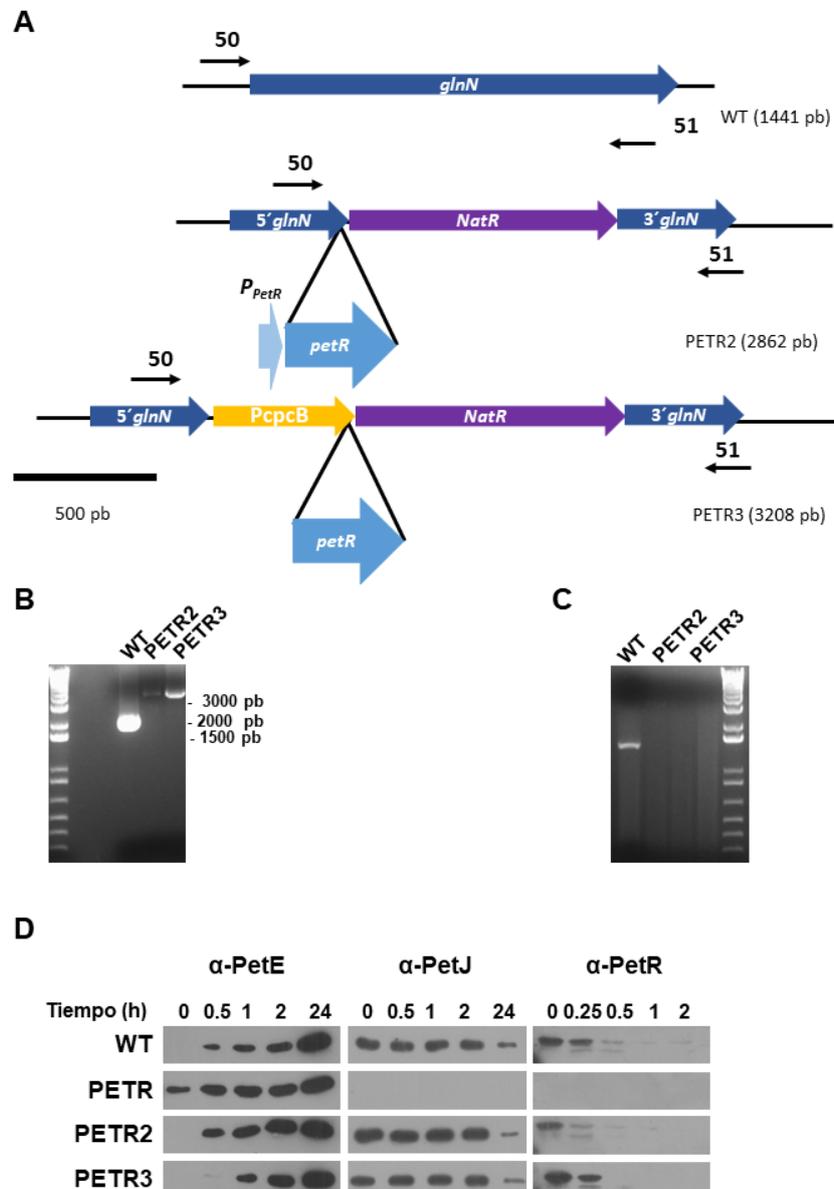


Figura 72. Análisis de la degradación de PetR en los mutantes PETER2 y PETER3 respecto a las estirpes WT y PETER. (A) Representación de la región génica *glnN* en la estirpe silvestre y

los mutantes PETR2 y PETR3. **(B)** Comprobación de la segregación mediante PCR de los mutantes PETR2 y PETR3 empleando los oligonucleótidos 50 y 51. **(C)** Comprobación de la segregación mediante PCR de los mutantes PETR2 y PETR3 empleando los oligonucleótidos 223 y 224. **(D)** Western Blot de PetJ, PetE y PetR en las estirpes WT (silvestre), PETR, PETR2 y PETR3 cultivadas en BG11c-Cu tras la adición de 500 nM de Cu a los tiempos indicados. Se cargaron 5 µg de proteína total de los extractos solubles y estas se separaron con un gel al 15% mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. Los anticuerpos empleados en estos análisis, así como su concentración, están descritos en la Tabla 12.

Debido a la importancia de este mecanismo probablemente su funcionamiento, se encuentra altamente conservado en las diferentes cianobacterias que presentan el operón *petRP*. Los efectos derivados de la ausencia de PetR o PetP, en cuanto al intercambio *petJ/petE*, no solo se observan en *Synechocystis* (Figuras 15 y 18), sino que son extensibles para cianobacterias filamentosas como *Anabaena* (Figura 38). Estas cianobacterias son lejanas evolutivamente entre sí, sugiriendo que la relación entre los componentes de este sistema se estableció de forma temprana y probablemente no se ha visto alterada. A pesar de esto, no se descarta que otras cianobacterias diferentes a *Synechocystis* cuenten con más dianas de PetR o PetP (Figura 21), pudiendo estar implicado en la respuesta incluso a otros metales que se relacionan con la homeostasis de cobre como el hierro (Waldron et al., 2007). Además, podrían existir componentes adicionales para responder de una forma más precisa antes leves cambios en las condiciones de crecimiento. Estos experimentos no solo han demostrado que el funcionamiento del sistema *petRP* respecto a la respuesta *petJ/petE* en las dos cianobacterias es similar, sino que, puesto que la respuesta a cobre en *Anabaena* en cuanto a la degradación de PetR es menos intensa que en *Synechocystis*, es posible que el sistema de captación de cobre de *Anabaena* sea menos eficiente. Esto explicaría que la respuesta en *Anabaena* corresponda con la que se observa en *Synechocystis* para una cantidad menor de cobre (Figura 13).

1.1. Características de la regulación mediada por PetR.

A pesar de que PetR es capaz de regular la expresión de *petJ* y *petE* mediante su unión directa a los promotores de los mismos (Figura 22) esta unión presenta diferente afinidad para cada promotor. El promotor de *petE* necesita de una menor cantidad de PetR para titular completamente al mismo que el del promotor de *petJ* (*in vitro*), por lo que PetR presenta una mayor afinidad por el promotor de *petE*. Estos resultados probablemente se deben al diferente tipo de unión de la proteína con ambos promotores. En el caso de *petE* la secuencia consenso de unión de PetR se presenta como repeticiones invertidas, mientras que en el caso de *petJ* la secuencia consenso se presentaría como repeticiones directas (Figura 23). Sus homólogos Blal y Mecl actúan como represores transcripcionales de *blaZ* y *mecA* mediante su unión a una secuencia constituida por dos repeticiones invertidas, en ambos casos esta secuencia consenso se encuentra, por tanto, cuatro veces (Lewis y Dyke, 2000; Carretto et al., 2002; Safo et al., 2005, 2006; Llarrull y Mobashery, 2012; Pence et al., 2015). En el caso de que la unión de PetR al DNA fuera igual a la de estos represores, el regulador debería presentar un dominio de dimerización (C-terminal) y otro de unión al DNA (N-terminal) y, por tanto, la interacción de dos monómeros mediante su extremo C-terminal permitiría su dimerización. Así se generaría un dímero capaz de unirse fácilmente a las repeticiones inversas. Sin embargo, puesto

que el promotor de *petJ* presenta repeticiones directas cercanas, en base a este modelo, un dímero de PetR debe unirse a cada repetición en cada lado de la hebra (Figura 73). Esto sugiere que posiblemente su mecanismo de unión cambiaría según actúe como represor o activador. Hasta ahora se había propuesto que Blal, Mecl y CopY actuaban exclusivamente como represores transcripcionales, sin embargo algunos estudios señalan que quizás puedan actuar también como activadores debido a diferentes conformaciones (Pence et al., 2015; Glauninger et al., 2017). Es probable que no se hayan encontrado dianas activadas por estos reguladores bacteriano porque en estos casos al actuar como activadores el sitio de unión presente diferencias respecto a cuando actúan como represores. Por tanto, al analizar bioinformáticamente los diferentes promotores de los genes y buscar exclusivamente repeticiones invertidas las posibles dianas a las que activaría no serían encontradas (Sala et al., 2009; Pence et al., 2015). El hecho de que un regulador transcripcional actúa como un represor y, posteriormente, se descubra también una función activadora es algo que ya ha ocurrido en proteínas como Fur, Zur o PurR (Delany et al., 2004; Seo et al., 2014; Sastry et al., 2019; Pinochet-Barros y Helmann, 2020).

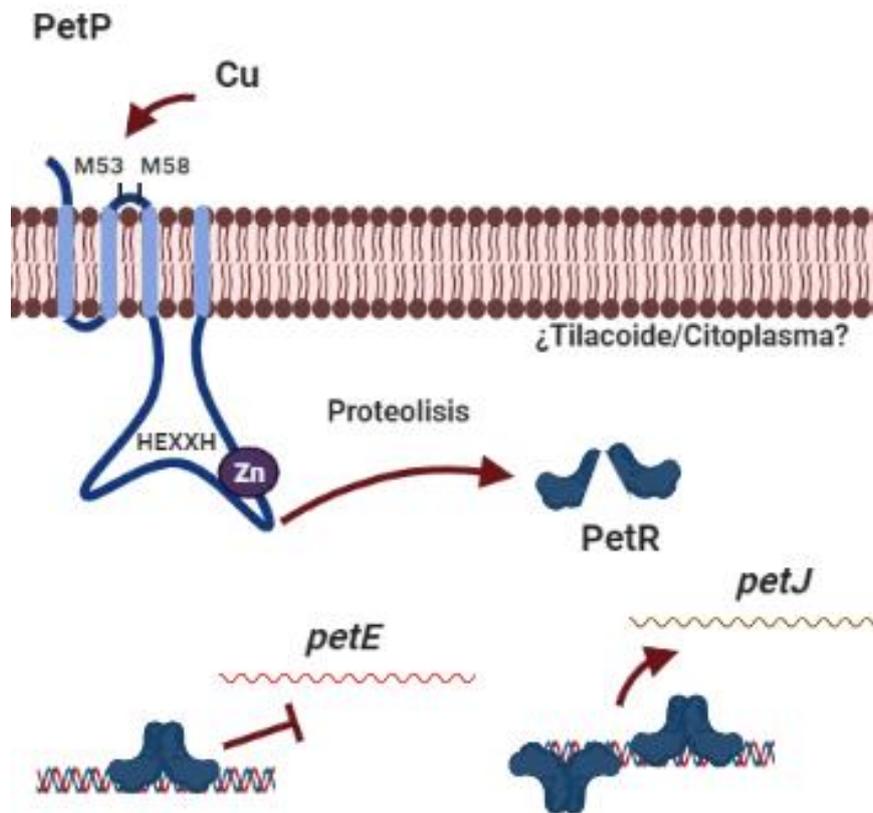


Figura 73. Esquema del mecanismo de regulación PetR/PetP. Mecanismo de regulación de la expresión de *petE* y *petJ*. PetP detecta, mediante las metioninas 53 y 58, el cobre y en respuesta a esto corta al regulador transcripcional PetR; PetR reprime la expresión de *petE*, mediante su unión como un dímero a las repeticiones inversas de su zona promotora, y potencia la expresión de *petJ* mediante la unión, probablemente como dos dímeros opuestos, a las repeticiones directas de su zona promotora.

En *Synechocystis* la unión de PetR a los promotores que regula es diferente dependiendo de su función sobre los genes. Así, aunque el regulón de esta proteína en *Synechocystis* es limitado y está constituido por los genes *petJ*, *petE* y *slr0601*-

02 (Figura 21) el mecanismo de acción es igual en todos aquellos genes donde actúa como activador, ya que *slr0601*, que codifica para una proteína de función desconocida, también presenta repeticiones directas (Figuras 21 y 24). Al igual que *petRP*, *slr0601-02* parecen formar una única unidad transcripcional, por lo que es probable que ambos genes participen en la respuesta a cobre como un sistema conjunto (Mitschke et al., 2011), aunque su función no está definida. La unión de PetR con los promotores de los tres genes se ha comprobado mediante la unión directa de la proteína con las secuencias de los mismos (Figuras 23 y 24). Esto descarta que sean necesarias otras proteínas para que PetR pueda unirse eficientemente a estos. Aunque el candidato más obvio para modular la afinidad de PetR es el cobre la presencia de este metal (en ambos estados redox) no afecta a la unión de esta proteína con los promotores (Figura 23). Aunque no podemos descartar que exista una modulación mediada por otras proteínas o moléculas como ocurre en MecI de *Staphylococcus aureus* en el caso de la γ -D-Glu-L-Lys (Amoroso et al., 2012). Además, la afinidad por uno u otro promotor no depende de que actúe como un activador o como un represor, pues la afinidad por el promotor de *slr0601* es similar a la de *petE* (Figuras 22 y 24). Por tanto, la afinidad no está determinada por la forma en que se una a los promotores, sino que debe existir algún mecanismo regulatorio. La función de este mecanismo regulatorio adicional puede ser asegurar que Cit_{c6} solo se sintetice cuando la cantidad de cobre en el medio sea mínima y, por tanto, Pc no pueda sintetizarse de forma eficiente. Por tanto, el que la afinidad por el promotor de *petJ* sea menor haría que la transcripción de esta proteína solo se activase en dichas condiciones. A diferencia de CopY este regulador no presenta diferencias en su afinidad con los promotores de forma dependiente de cobre (Solioz y Stoyanov, 2003; Portmann et al., 2006), lo que señala que posiblemente PetR no presenta una región de unión a metales (Figura 22) sino que la regulación mediada por metales la ejerce PetP sobre PetR.

El sitio de corte de las proteasas BlaRI y MecRI en los reguladores de bacteria Blal y MecI se encuentra entre los residuos Asn101 y Phe102, los cuales están altamente conservados en MecI y Blal (García-Castellanos et al., 2003; Peacock y Paterson, 2015). PetR también presenta un residuo de fenilalanina altamente conservado, cercano a esta posición, que está presente en todas los PetR cianobacterianos en torno a la posición 100 (Phe98 en *Synechocystis*) (Figura 12). Dependiendo de la especie el aminoácido anterior a esta fenilalanina es un residuo variable, por lo que la asparragina no está conservada en cianobacterias (Figura 12B). Si este es el sitio de corte de la proteasa en cianobacteria, se generaría un fragmento de 11,12 kDa tras el procesamiento de PetR por PetP mientras que el peso molecular de PetR sin cortar es 15,9 kDa; esta diferencia en cuanto al peso molecular correspondería con los valores calculados para el doble bandeado que se obtiene de PetR en la estirpe silvestre tras la adición de cobre (Figuras 13 y 15C). La eliminación de este residuo por una alanina en MecI genera un regulador incapaz de ser procesado por MecR pero, puesto que la proteína resultante también es incapaz de unirse con el DNA, es necesario un estudio más profundo sobre este aspecto para determinar si el efecto asociado a este cambio se debe a que el sitio de corte se encuentra en este residuo o simplemente se produce un cambio conformacional que genera una proteína MecI cuya conformación no es reconocida por MecR1 (García-Castellanos et al., 2004).

1.2. Características de la regulación mediada por PetP.

La detección de cobre de este sistema de regulación está mediada por PetP. Esta proteasa es la encargada de degradar PetR en respuesta a cobre (Figuras 18, 26 y 69). PetP actúa aguas arriba de PetR produciendo su degradación específica, pues el doble mutante de ambos genes presenta las mismas características que la estirpe PETR. Por tanto, las estirpes PETERP y PETER fueron indistinguibles en lo relativo al intercambio *petJ/petE*, a la capacidad de crecer en uno u otro medio o a su capacidad fotosintética (Figuras 15, 19 y 35). Puesto que PETERP no presenta diferencias respecto a PETER probablemente en *Synechocystis* la actividad de PetP no tenga múltiples dianas, al igual que ocurre con la actividad reguladora de PetR (Figura 21). Aun así, es posible que PetP pueda actuar como proteasa sobre otras dianas, pero esto solo ocurriese en unas condiciones específicas. Ya que la respuesta, en lo relativo a la acumulación de Cit_{c6} y Pc y la degradación de PetR, muestra diferencias dependiendo de la cantidad de cobre en el medio (Figura 13) la activación de PetP en respuesta a cobre puede ser gradual o contar con diferentes grados de activación, algo que también se ha observado en algunos mutantes generados (Figuras 31 y 32). Independientemente del tipo de activación de PetP, su efecto en PetR no necesitaría de la asistencia de ninguna otra proteína. Pues al introducir este sistema (*petRP*) en *E. coli* la proteasa mantiene su actividad sobre PetR, como ocurre con *Synechocystis* (Figura 26). Esto indica que no debe haber ninguna otra proteína necesaria para que PetP actúe sobre PetR (ya que este sistema está ausente en *E. coli*) y puesto que la velocidad de degradación de PetR-GST es similar en ambos organismos esto sugiere que no debe existir ninguna proteína necesaria para favorecer su efectividad. Aun así, podrían existir otras proteínas en cianobacterias, como MecR2 en bacterias (Arède et al., 2012), capaces de, ante diferentes estímulos o ante el mismo cobre, acelerar la respuesta, favorecer la degradación de PetR o la separación de PetR del DNA. Esto estaría apoyado por la leve degradación, dependiente de cobre, de PetR en el mutante PETERP (Figura 20).

Las metaloproteasas bacterianas MecRI y BlaRI, homólogas de PetP, se caracterizan estructuralmente por presentar 4 hélices transmembrana, tener en su extremo C-terminal un motivo sensor periplásmico encargado de determinar la presencia de antibiótico y un motivo HEXXH en su cara citoplasmática donde las dos histidinas y el glutámico son los encargados de unir el zinc necesario para su actividad (Rawlings y Barrett, 1995; Golemi-Kotra et al., 2003; Cha et al., 2007). PetP comparte estas características con las metaloproteasas, incluso conteniendo el motivo HEXXH en el lazo entre el tercer y cuarto segmento transmembrana, excepto que PetP carece de un motivo C-terminal periplásmico/citosólico (Figura 16). Estas proteasas parecen contar con una capacidad autocatalítica dependiente de su unión a zinc, catalizada por el residuo de glutámico del motivo HEXXH, que actuaría entre el tercer y cuarto segmento transmembrana y haría que pasaran a un estado activo independientemente de la señal activadora (Llarrull y Mobashery, 2012; Belluzo et al., 2019). Es posible que PetP cuente también con esta capacidad autocatalítica. Aunque el sitio de autocorte no está conservado en cianobacterias, en el lazo que une el tercer y cuarto segmento transmembrana de PetP se encuentran secuencias altamente conservadas que incluyen argininas como las del

sitio de autocorte de BlaR1 y MecR1 (García-Castellanos et al., 2003). Es posible que, al igual que en los residuos del sitio de corte de PetR, el sitio de autocorte de PetP presente diferencias con respecto al conservado en MecR1 y BlaR1. Tampoco se encontraron secuencias análogas a los sitios de autocorte de HtpX, las cuales difieren levemente de las de MecRI y BlaRI (Sakoh et al., 2005; Yoshitani et al., 2019). Sin embargo, se ha comprobado, en PetP, la importancia de las histidinas del motivo conservado HEXXH, tanto en bacterias como en cianobacterias (Figura 30). La eliminación de las histidinas de este motivo genera una proteasa incapaz de actuar sobre PetR incluso en presencia de cobre, es decir, el comportamiento de la estirpe PETRP+HAHA es igual al de la estirpe PETA. Esto indica que ambos residuos, al igual que en el caso de BlaRI, MecRI y HtpX, son esenciales para la funcionalidad de la proteasa (Rawlings y Barrett, 1995; Sakoh et al., 2005; Yoshitani et al., 2019). A pesar de esto, se desconoce si la esencialidad se debe a la necesidad de coordinar con Zn o si estas histidinas pudieran participar, junto al residuo de glutámico, en un posible autoprocésamiento necesario para la activación de PetP como en el caso de BlaRI y MecRI. Por la alta similitud de PetP en este aspecto con las proteasas bacterianas el estudio de la importancia de estas histidinas podría ser extrapolable a las proteínas implicadas en la resistencia a antibiótico.

PetP, a diferencia de las proteasas bacterianas, es capaz de detectar cobre y actuar en respuesta al mismo (Figura 26) en un proceso mediado por las metioninas 53 y 58. Estos residuos están totalmente conservados en las diferentes cianobacterias que presentan *petP* en su genoma (Figura 16C). En diferentes estudios se ha determinado que las metioninas podrían ser los principales aminoácidos encargados de coordinar con cobre (Lu, 2003; Le Sueur et al., 2016) y dado el alto grado de conservación, sugería que ambas metioninas podrían estar implicadas en la detección del cobre por PetP. Ya que la mutación a alanina de estas metioninas genera una alteración en la respuesta a cobre de la proteasa (Figura 33), se demuestra que son las encargadas de detectar el cobre en el medio. La mutación de cada una de estas metioninas por separado produjo una disminución en la capacidad de responder al cobre añadido, pero no una total pérdida de la función proteasa como en el caso de los mutantes PETA y PETRP+HAHA, lo que indica que el efecto en la detección de cobre de cada metionina es cooperativo (Figuras 32 y 33). Sin embargo, la eliminación de ambas metioninas genera una estirpe con un fenotipo similar al de las estirpes PETA y PETRP+HAHA, es decir, incapaz de detectar cobre. Esto indica que son estos dos residuos, M53 y M58, los encargados de unir el cobre y así determinar si este metal se encuentra o no en el medio. Por tanto, son necesarias para activar el mecanismo de respuesta PetR/PetP.

Además, se desconoce en qué membrana se encuentra esta proteasa en cianobacterias, pudiendo encontrarse tanto en la membrana plasmática, como es el caso de MecRI y BlaRI, como en la membrana tilacoidal. Ya que la mayoría del cobre de *Synechocystis* está secuestrado en los tilacoides unido a la plastocianina (Totter et al., 2008, 2012) y CopS, que actúa como sensor de cobre en el sistema de resistencia está en la membrana tilacoidal y plasmática (Giner-Lamia et al., 2012). Esta localización le permite a CopS responder tanto a los niveles externos de cobre como al cobre que pueda liberarse de la Pc. Es por tanto posible que PetP se localice también en ambas membranas permitiendo también esa respuesta a la presencia de cobre extracelular o el liberado por la degradación de Pc.

2. Implicaciones de la regulación y desregulación del sistema *petJ/petE*.

El sistema de intercambio *petJ/petE* permite que a las cianobacterias con ambos transportadores destinar el hierro disponible, cuando hay cobre en el medio, a otras proteínas que no cuentan con otra alternativa sin hierro. Por tanto, es un mecanismo importante que permite a las cianobacterias adaptarse a los posibles cambios que puedan ocurrir en el medio en relación con la disponibilidad de metales. Este sistema de intercambio cuenta con varios niveles de regulación, llevados a cabo por diferentes proteínas. El primer nivel es transcripcional y está mediado por PetR. Este regulador se une a la región promotora del DNA de los genes *petJ* y *petE* y como resultado de esta interacción se promueve o reprime su transcripción (Figuras 21 y 22). Sin embargo, ya que tanto el mutante PETR como el mutante PETP no presentan una acumulación constitutiva de Cit c_6 y Pc en ausencia y presencia de cobre (Figura 20), a diferencia de lo que ocurre con el RNA_m que codifica para dichas proteínas (Figuras 15A y 18A), esto indica que debe existir un sistema de regulación postranscripcional de estos mensajeros. Este mecanismo debe ser un segundo método de control para impedir que las proteínas adquieran una conformación adecuada o se traduzcan ante la ausencia de cobre en el caso de Pc y ante la presencia del mismo en el caso de Cit c_6 . Pc, al ser una cupropoteína, es posible que, en ausencia total de cobre debido a la presencia de BCSA, no pudiera plegarse correctamente y quedase en una forma no funcional fácilmente degradable. Sin embargo, ya que en el medio BG11c hay hierro disponible y, a pesar de esto, la cantidad de Cit c_6 disminuye respecto a un medio sin cobre disponible (Figura 20), la necesidad del metal para plegarse correctamente no es la causa exclusiva de este fenómeno. Independientemente de este posible mecanismo desconocido de regulación, los resultados obtenidos señalan que, incluso en un medio que presenta una alta cantidad de quelante específico de cobre (BCSA), la estirpe PETR es capaz de acumular Pc a niveles muy reducidos (Figura 15B). Además, esta proteína debe ser funcional pues permite el crecimiento de dicha estirpe en estas condiciones. Esto indica que el transportador de cobre al interior celular debe presentar una afinidad mayor que el BCSA por el cobre. Por lo que, incluso en estas condiciones hay una cantidad baja de cobre en el interior celular, la cual debe estar por debajo del límite de percepción de cobre de PetP, pues en dichas condiciones PetR reprime la expresión de *petE* (Figura 15A). Se ha demostrado que uno de los posibles mecanismos de regulación de la cantidad de Cit c_6 es el RNA_{nc} IsaR, que reprime la expresión del mismo y a su vez se encuentra regulado por la presencia de hierro (Fur reprime a IsaR cuando hay hierro) (Georg et al., 2017). Sin embargo, este mecanismo no guarda relación con el sistema PetR/PetP ya que este RNA no se expresa diferencialmente en las estirpes afectadas en la regulación Cic₆/Pc o frente a cambios en la disponibilidad de cobre (Figura 74).

En cuanto a la posible presencia de un transportador electrónico alternativo a Cit c_6 y Pc en *Synechocystis* en este trabajo se ha demostrado que no es posible obtener una estirpe totalmente segregada carente de ambos transportadores (estirpe PETEJ; Figura 33B). Además, tampoco pudieron obtenerse las estirpes PETJP, PETER y PETERP (Figura 33C, 33D). Puesto que PetR promueve la expresión de *petJ* y reprime la de *petE* un doble mutante PETER, así como el mutante PETERP, no expresaría *petE* y, además, no se promovería la expresión de *petJ*. Del mismo

modo el doble mutante PETJP no expresaría *petJ* y se regularía negativamente la expresión de *petE* en cualquier condición. De forma que la cantidad de Cit c₆ en PETERP y PETER, así como de Pc en la estirpe PETJP (la cual se encontraba por debajo de los límites de detección analizados) (Figura 34) no sería suficiente como para permitir la supervivencia de la estirpe. Esto apoya, por tanto, que no existe un mecanismo de transferencia electrónica alternativa a estas dos proteínas entre el citocromo b₆f y el fotosistema I y que el sistema PetRP es esencial para la expresión controlada de dichos genes.

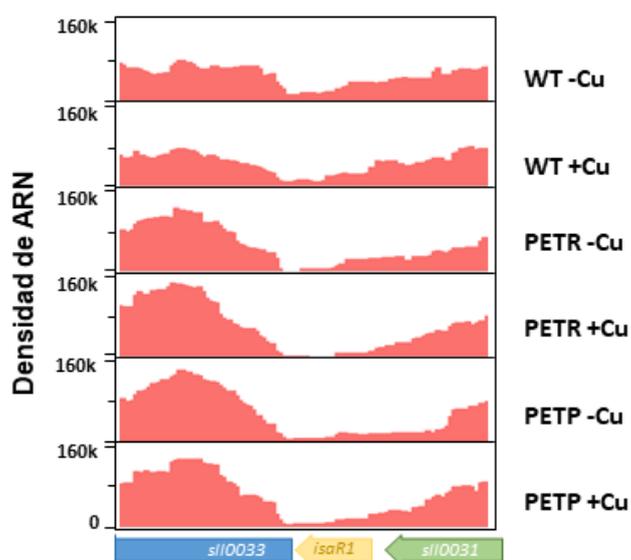


Figura 74. Niveles de *isaR1* en los mutantes PETR y PETP. Lecturas de *isaR1* detectadas en el RNA-seq de las estirpes silvestre, PETR y PETP previa y posteriormente a la adición de 500 nM de Cu. Los resultados provienen de tres experimentos independientes.

Aunque los mutantes PETJ y PETE y los mutantes del sistema regulador PETR, PETP y PETERP son capaces de crecer con diferente disponibilidad de cobre, estas estirpes presentan diferencias en cuanto al crecimiento. Se ha determinado que la capacidad de crecer en medio con cobre de PETP y PETEP se debe a la expresión en dichas condiciones de Cit c₆. De igual forma en los mutantes PETR y PETERP se detectan bajos niveles de Pc aun en medio con BCSA, lo que permite que sobrevivan en estas condiciones (Figuras 15, 18 y 19). Además, las estirpes PETJ y PETJR acumulaban una baja cantidad de Pc en medio sin cobre disponible (Figura 33B), algo que también ocurre en la estirpe silvestre. En el mutante PETE y en la estirpe silvestre, incluso en medio con cobre disponible pudo detectarse la presencia de Cit c₆ (Figura 33C). Esto posibilita el crecimiento de las estirpes en todas las condiciones analizadas y señala que el sistema de regulación PetR/PetP no ejerce una regulación todo-o-nada. Por tanto, aunque aumenta o disminuye la expresión de uno u otro gen (Figuras 15A y 18A), la acumulación de una u otra proteína se producirá aunque esté reprimida o no esté activada la expresión génica. Estos bajos niveles de una u otra proteína en las condiciones desfavorables para la misma son las que permiten el crecimiento de PETJ, PETJR, PETJRP, PETE y PETEP (Figura 34A). Sin embargo, puesto que no se permite la segregación de las estirpes PETJP, PETER y PETERP, la cantidad de Pc en la primera y Cit c₆ en el resto de las estirpes debe ser demasiado baja como para permitir un transporte electrónico eficiente (Figura 33).

A pesar de que PETJ y PETE son capaces de crecer en medio sin cobre y con cobre disponible, estas estirpes presentan una disminución en el crecimiento y defectos en la fotosíntesis (Figuras 34 y 35), algo que ya estaba descrito (Ardelean et al., 2002; Durán et al., 2004; Ivanov et al., 2012; Wang et al., 2013). Esto también se mantuvo para los mutantes PETR y PETP en medio sin cobre y con cobre disponible respectivamente (Figura 35). En el caso de cultivos líquido el retraso en el crecimiento se favorece en alta irradiancia, lo que indica que la cantidad que hay de cada uno de estos transportadores, aunque les permite sobrevivir, no es suficiente cuando el transporte electrónico fotosintético es mayor. De forma que la cantidad de Cit c_6 y Pc en medio sin cobre y con cobre que se acumula en la estirpe silvestre no constituye un exceso de los mismos, sino que es una adaptación que le permite sobrevivir cuando los requerimientos fotosintéticos sean mayores. Además, puesto que la disminución en la capacidad fotosintética de PETR en medio sin cobre fue menor que la de PETJ la expresión constitutiva de *petE*, permitida por la falta de PetR, genera unos niveles superiores de Pc que en la estirpe silvestre (en la que la expresión está reprimida) permitiendo una mayor eficiencia (Figura 35). A pesar de la acumulación de Cit c_6 en medio con cobre en la estirpe PETP, esta presenta un ligero retraso en el crecimiento, debido probablemente a que los niveles de este transportador son inferiores a los de Pc en la estirpe silvestre. Ya que cobre es un metal tóxico cuando se encuentra en exceso (Giner-Lamia et al., 2012, 2014, 2016b) el menor crecimiento de la estirpe PETE puede deberse a que perder esta proteína como principal sumidero de cobre sea altamente deletéreo (Giner-Lamia et al., 2016b).

Todo esto señala la importancia de la presencia de unos niveles adecuados de Cit c_6 y Pc para sobrevivir en las diferentes condiciones de crecimiento y la importancia de una correcta regulación de la expresión de los mismos. La regulación se encuentra conservada en las distintas cianobacterias (probablemente en todas aquellas que presenten el sistema de regulación *petRP*) ya que hemos demostrado que está conservada en dos cianobacterias filogenéticamente distantes como *Synechocystis* y *Anabaena* (Figura 36). Aunque existen diferencias entre ellas como son la distinta sensibilidad y duración de la respuesta a cobre, diferencias que probablemente estarán relacionadas con el metabolismo del cobre y el hierro en ambas estirpes. Posiblemente este sea un sistema de regulación muy robusto donde PetP al detectar cobre cataliza el corte de PetR, favoreciendo su degradación, y PetR actúa promoviendo la expresión de *petJ* e impidiendo la expresión de *petE* (Figura 74).

II. Regulación del ciclo del carbono mediada por las actividades FBPasa y SBPasa.

Una de las principales características del ciclo CBB en cianobacterias, con respecto a otros organismos fotosintéticos, es la presencia de una enzima dual FBP/SBPasa que realiza ambas actividades en el ciclo CBB. Esta enzima cumple una función tan importante y necesaria que se ha encontrado en los diferentes clados cianobacterianos, excepto en *Atelocyanobacterium thalassa* (aislada ALOHA). Esta cianobacteria fijadora de nitrógeno no presenta genes de diferentes rutas esenciales como son el ciclo de CBB y la biosíntesis de aminoácidos o de algunos componentes del PSII (Tripp et al., 2010). Por tanto, es posible que, al igual que otros genes del mismo ciclo, a lo largo de la evolución haya perdido esta enzima. Algunas cianobacterias cuentan con otra enzima cuya actividad es exclusivamente FBPasa, esta enzima no se encuentra en la cianobacteria anteriormente mencionada, el clado de los *Prochlorococcus* y *Cyanobium*, un gran número de las diferentes especies de *Synechococcus* y *Chamaesiphon minutus* (Figura 74). Por tanto, en estos organismos tanto la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa necesaria para fijar carbono durante el ciclo CBB como la que permite aumentar la producción de poder reductor mediante la ruta OPP la realizará la enzima bifuncional. Los niveles de expresión de una y otra enzima varían en las diferentes estirpes de cianobacteria, de forma que en algunas de estas la expresión de la enzima bifuncional es mayor, como *Synechocystis*, y en otras los niveles de expresión de ambos genes son similares (Gerbling et al., 1986; Tamoi et al., 1996, 1998; Guo et al., 2014). A pesar de que los niveles de expresión de ambas enzimas puedan ser similares la actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa de la enzima simple es menor, aproximadamente un 50%, que la de la enzima dual (Tamoi et al., 1996) (Figuras 45 y 46). Ambas proteínas estructuralmente son similares a la FBPasa citosólica de plantas (Tamoi et al., 1996) aunque se diferencian de esta al presentar regulación redox de su actividad, algo que comparten con la contraparte cloroplastídica. Así, la FBP/SBPasa es activa en su forma reducida (Miyagawa et al., 2001; García-Cañas, 2015) y la FBPasa es activa oxidada (Gómez Romero, 2015) (Figuras 45 y 46). Por tanto, aquellas estirpes que solo presentan la enzima dual deben presentar una regulación adicional que favorezca la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en oscuridad y ambas actividades en luz. Posiblemente para estas cianobacterias la regulación redox de la FBP/SBPasa analizada en *Synechocystis* dependiente de la presencia de luz (Figura 55) sea diferente o presente una regulación adicional. Se cree que el origen de la enzima FBPasa cianobacteriana es un ancestro común con la SBPasa cloroplastídica que procede de una FBPasa anterior. Esta FBPasa se especializó en ambas enzimas de manera diferencial. Sin embargo la FBP/SBPasa comparte un ancestro común con la FBPasa cloroplastídica (Jiang et al., 2012b; Gutle et al., 2016). Por tanto, las similitudes entre estas proteínas no se deben a su origen evolutivo sino a una convergencia evolutiva.

Tree scale: 0.1

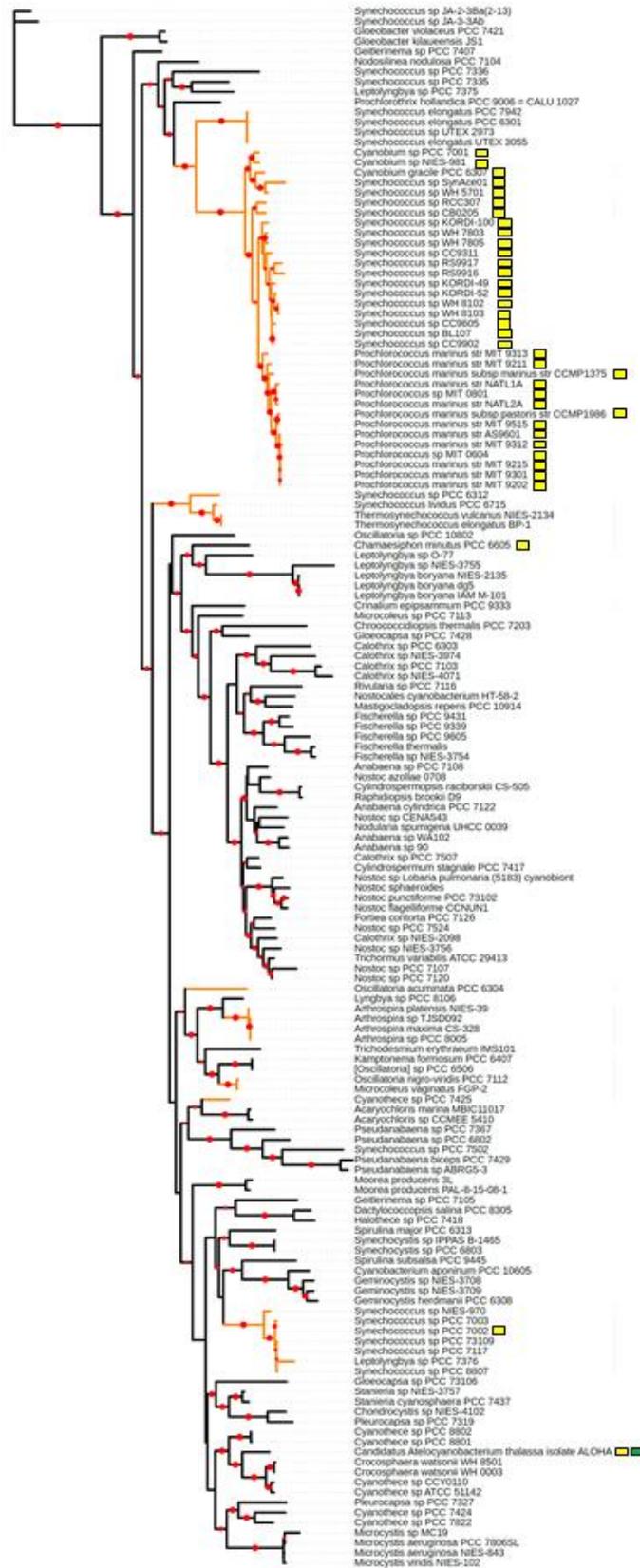


Figura 75. Análisis de la ausencia de la FBPasa FBP/SBPasa en las cianobacterias. Árbol filogenético de las principales cianobacterias junto a la representación de la ausencia del gen

slr0952 (amarillo) y *slr2094* (verde). Todos los Bootstrap se encuentran entre 70 y 100, cuanto mayor sea el diámetro del círculo rojo de cada nodo mayor será este valor.

Las proteínas implicadas en la fijación de carbono y las rutas relacionadas con el propio carbono en *Synechocystis* representan un elevado porcentaje respecto al resto de proteínas, este porcentaje es parcialmente invariable independientemente de la cantidad de carbono disponible (o glucosa extracelular) o la intensidad luminosa. Aunque el aumento de la intensidad luminosa produce un ligero incremento de la cantidad de este conjunto de proteínas (Jahn et al., 2018). Sin embargo, que el conjunto de proteínas implicadas en la fijación de carbono no varíe no descarta posibles cambios puntuales en algunas de las mismas o que no sufran una regulación postraduccional. En el caso de las FBPasas de *Synechocystis* tanto la FBPasa como la FBP/SBPasa mantienen unos niveles prácticamente invariables ante cambios en la intensidad luminosa, una mayor disponibilidad de carbono a la usual o la presencia de glucosa en el medio (Figura 39). En cambio, ambas proteínas aumentan en condiciones de bajo carbono (aire), lo que se probablemente corresponda con un intento de compensar la disminución del carbono fijado ante la disminución en la disponibilidad del mismo. En estas condiciones las actividades SBPasa y FBPasa, que forman parte del ciclo de CBB, se inducirían para favorecer la fijación de CO₂. El aumento de la FBPasa en fotoheterotrofia podría corresponder con el potenciamiento de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato en condiciones de baja luz y baja fijación de carbono en cianobacterias (Wan et al., 2017; Ueda et al., 2018). Ya que ambas proteínas presentan regulación redox, regulación por Mg, mediada por pH e inhibición por AMP, en el caso de la FBP/SBPasa, es muy probable que aun cuando no haya un cambio en la cantidad de las mismas sí cambia su estado redox y actividad enzimática (Figuras 44, 55, 56 y 65) (Tamoi et al., 1996, 1998; Sun et al., 2012; Feng et al., 2013; Gómez Romero, 2015). También cabe la posibilidad de que se produzca una alteración rápida y transitoria en la cantidad de estas proteínas ante los cambios, buscando con esto equilibrar de nuevo la situación metabólica y, posteriormente, vuelvan a los niveles iniciales de las mismas.

1. Importancia de la FBPasa y la FBP/SBPasa en *Synechocystis*.

1.1. Importancia de la FBP/SBPasa en el metabolismo.

La enzima FBP/SBPasa es esencial para el crecimiento fotoautotrófico (Figura 40) (Yan y Xu, 2008; García-Cañas, 2015), así su ausencia genera una estirpe ($\Delta F/S$) que necesita de una fuente de carbono reducida, como la glucosa, para sobrevivir. El crecimiento de esta estirpe, además, está favorecido tanto en mixotrofia como en fotoheterotrofia (Figura 40). En baja luz (inferior a 40 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y con una fuente de carbono exógeno, como la glucosa, la principal ruta encargada de metabolizar esta glucosa, y en general la principal ruta activa, será la ruta OPP (Yang et al., 2002; Nakajima et al., 2014, 2017; You et al., 2014). Esta ruta comparte intermediarios con el ciclo CBB, por lo que una parada del ciclo de fijación de carbono debido a la falta de la FBP/SBPasa podría ser beneficioso en dichas condiciones debido a que en este caso dos rutas opuestas no emplearían a la vez estos intermediarios. En *Prochlorococcus*, debido a la falta de fosfofructoquinasa, las principales rutas implicadas en la metabolización de glucosa son Entner-Doudoroff (ED) y OPP (Muñoz-Marín et al., 2017). Hay diversas teorías que señalan

en condiciones de iluminación, donde la fotosíntesis es activa y se realiza eficientemente, la principal ruta encargada de la metabolización de la glucosa es la ruta ED (Chen et al., 2016; Makowka et al., 2020) puesto que esta ruta no comparte intermediarios con el ciclo CBB. Por tanto, la ruta ED en mixotrofia, siempre que la intensidad luminosa no fuera inferior a $40 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y por tanto hubiera una fijación activa de carbono, sería energéticamente más favorable pues ninguno de los compuestos carbonados generados en la misma podría ser empleados por el ciclo de CBB para fijar carbono. De forma que en condiciones de luz/oscuridad o intensidad de luz superior a $40 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sería principalmente la ruta ED la encargada de metabolizar esta glucosa. La base de esta teoría es que las cianobacterias no cuentan con una compartimentalización celular, como sí ocurre en las células eucariotas. Por tanto, que el ciclo de CBB no sea funcional por la ausencia de la FBP/SBPasa en baja luz podría favorecer la ruta OPP, pues aquellos intermediarios conjuntos de ambas rutas (todos los metabolitos excepto la sedoheptulosa-1, 7-bisfosfato) que se emplearan en la fijación de carbono posiblemente ya no se destinarían a la ruta CBB. Por tanto, en la estirpe $\Delta\text{F/S}$ se favorecería el crecimiento con una fuente de carbono exógeno al poder realizar las rutas del catabolismo de la glucosa, como son glucólisis y OPP que comparten intermediarios con el ciclo CBB, más eficientemente. Posibilitando así que la estirpe $\Delta\text{F/S}$ presente una mejora en el crecimiento en dichas condiciones (Figura 40). Esto, unido a la determinación *in vitro* e *in situ* de que la enzima bifuncional es activa en condiciones reductoras (Figuras 44 y 45) establece que posiblemente, en cianobacterias donde estén presente esta enzima y la FBPasa, la actividad FBPasa de la FBP/SBPasa estará relacionada exclusivamente con la fijación de carbono y no con la obtención de poder reductor mediante la ruta OPP.

En *Synechococcus* y *Prochlorococcus* los niveles de transportadores de glucosa varían dependiendo de la disponibilidad de la misma en el medio, entre otros aspectos (Moreno-Cabezuelo et al., 2019). En *Synechocystis* el transportador de glucosa, *gtr* (slI0771) (Schmetterer, 1990), no se ha determinado que experimente cambios en su expresión o actividad dependiendo de las condiciones del medio. Por tanto, aunque es probable que la disminución de glucosa en el medio se deba a un mayor consumo de la misma y, por tanto, un favorecimiento de su importe, no se ha podido determinar que no se haya cambios en la cantidad de este transportador en las estirpes $\Delta\text{F/S}$ o ΔF . La disminución más acusada de la glucosa en el medio de $\Delta\text{F/S}$ en condiciones mixotróficas señala que su consumo mediante las diferentes rutas de metabolización de glucosa es mayor y, por tanto, su importe está más favorecido (Figura 41B). Además, en el interior celular esta glucosa no se almacena como un excedente en forma de glucógeno, ya que los niveles de este son similares a los de la estirpe silvestre (Figura 41C). Por tanto, el catabolismo de la glucosa será necesario para poder obtener el poder reductor, así como la fuente de carbono, suficientes para sobrevivir ya que esta estirpe no puede realizar el ciclo CBB. De forma que el poder reductor que podría generarse en mixotrofia mediante la fotosíntesis debe ser insuficiente. En estas condiciones presenta un mayor consumo de oxígeno y, por tanto, una mayor tasa respiratoria (Figuras 42 y 44). Puesto que la tasa fotosintética es igual a la de la estirpe silvestre (Figura 42), la mejora que experimenta $\Delta\text{F/S}$ se debe a un potenciamiento en el catabolismo de la glucosa y en la respiración (Makowka et al., 2020).

La estirpe $\Delta F/S$ tras 3 días de crecimiento fotoautotrófico muere, a pesar de contener glucógeno que podría ser empleado como una posible fuente de carbono. Incluso entre las 24 y 48 horas en dichas condiciones la cantidad de glucógeno almacenada en la estirpe $\Delta F/S$ se mantiene estable (Figura 41D), por tanto, en esta estirpe debe acumularse algún metabolito que provoque su muerte o impida la metabolización de glucógeno. Las rutas OPP y ED son las principales encargadas de movilizar el glucógeno (la ruta ED en el caso de que la fotosíntesis sea activa (Doello et al., 2018)), por lo que es posible que se produzca una redirección anómala del flujo que induzca su inhibición en dichas condiciones en el mutante $\Delta F/S$. Sin embargo, tras 48 horas de crecimiento fotoautotrófico se observa que la ausencia de la FBP/SBPasa provoca una inhibición en la producción de oxígeno (Figura 43). Lo que indica que esta estirpe pierde la capacidad fotosintética entre las 24 y 48 horas. Esto coincide con la incapacidad de la estirpe para movilizar glucógeno (Figura 41). Sin embargo, la acumulación del metabolito que provoca la parada de la estirpe $\Delta F/S$ no debe afectar a las rutas del catabolismo de la glucosa ya que en otras condiciones tróficas la capacidad metabólica de la estirpe $\Delta F/S$ se mantiene (Figura 40D). Por tanto, en esta estirpe se produce una acumulación que impide la degradación de glucógeno y la cadena de transporte electrónico exclusivamente en fotoautotrofia, pudiendo ser un metabolito del ciclo CBB con un efecto pleiotrópico que compartiría con las rutas del catabolismo de la glucosa.

1.2. Importancia de la FBPasa en el metabolismo.

Esta enzima, a diferencia de la FBP/SBPasa, no está presente en todas las cianobacterias (Figura 74) por lo que su función en el metabolismo del carbono en *Synechocystis* probablemente pueda ser parcialmente realizada por la enzima bifuncional. Esto se apoya en que las estirpes ΔF y silvestre presenten grandes similitudes en la tasa de crecimiento en fotoautotrofia, mixotrofia y fotoheterotrofia, velocidad en la incorporación de la glucosa extracelular, tasa fotosintética y tasa respiratoria (Figuras 40, 42, 43 y 44). Por lo que la FBP/SBPasa en estas condiciones desempeña su función en el ciclo de CBB y la función de la FBPasa en la ruta OPP o gluconeogénesis. Sin embargo, no es posible obtener un doble mutante $\Delta F\Delta F/S$ (Figura 40). Esto sugiere que la función FBPasa en la ruta OPP es esencial para poder metabolizar glucosa (única condición en que puede sobrevivir el mutante $\Delta F/S$) (Yang et al., 2002; You et al., 2014; Nakajima et al., 2017; Wan et al., 2017; Ueda et al., 2018). La segregación de una estirpe que carezca de ambas enzimas de *Synechocystis* solo fue posible al introducir los genes de la FBPasaPs (estirpe $\Delta F/S\Delta F+F$) o la SBPasaAt (estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$), en ambos casos se genera una estirpe con actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa. (Figuras 57, 58, 59 y 65). Esto ratifica la esencialidad de una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa para metabolizar glucosa. Por lo que la regeneración de NADPH mediante el ciclo OPP es esencial en mixotrofia y fotoheterotrofia a baja luz y el poder reductor que se genere por otras rutas catabólicas debe ser insuficiente. Ya que la expresión de la SBPasaAt aumento solo un 18% de actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa respecto a la estirpe silvestre con altas concentraciones de magnesio, condiciones que posiblemente no se encuentren en el interior de *Synechocystis* (Figura 65), la actividad FBPasa de la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$ será baja. Lo que hace que la tasa de crecimiento de esta estirpe

sea baja (Figura 60). Sin embargo, esta actividad FBPasa es suficiente para que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$ pueda segregarse.

Mientras que la FBPasa es activa oxidada la máxima actividad de la FBP/SBPasa se obtiene cuando esta enzima se encuentra reducida y, además, la actividad máxima de la enzima dual es de, aproximadamente, el doble de la enzima FBPasa (Figuras 44, 45 y 46) (Tamoi et al., 1996). Esto señala que la FBP/SBPasa estará principalmente activa durante la fijación del carbono, como es el caso de la FBPasa y la SBPasa cloroplastídicas de plantas (Pradel et al., 1981; Dunford et al., 1998b, 1998a), y solo parcialmente activa en las condiciones donde se obtendría poder reductor mediante la OPP, mientras que la FBPasa estaría activa en las condiciones contrarias. Por tanto, en condiciones de crecimiento estándar, ya que la estirpe ΔF presenta el mismo fenotipo que la estirpe silvestre la población activa de la FBP/SBPasa (Figuras 55 y 56) cataliza una actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa suficiente para permitir la generación de poder reductor mediante la ruta OPP. A pesar de esto, la FBP/SBPasa no es capaz de cumplir eficientemente la función de la FBPasa durante los ciclos de luz/oscuridad (Figura 40). Además, la estirpe ΔF consume glucógeno más lentamente que la estirpe silvestre en baja luz tanto en presencia como en ausencia de glucosa tras ser transferida a estas condiciones desde mixotrofia (Figura 42). Puesto que la ruta OPP actúa principalmente en estas condiciones y es la ruta mayoritaria para la utilización de la glucosa derivada de la degradación de glucógeno (Doello et al., 2018), probablemente sea necesaria una mayor actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa que la generada por la FBP/SBPasa en dichas condiciones. Esto unido al aumento de la expresión de esta enzima en oscuridad (Saha et al., 2016) indica la importancia de la ruta OPP como fuente de poder reductor en la metabolización de glucosa en baja luz y que es la FBPasa la enzima encargada de esta función.

1.3. Importancia de la regulación de las FBPasas.

La mayoría de los estudios *in vitro* realizados con anterioridad sobre regulación redox empleaban agentes oxidantes artificiales como el cobre o DTNB. Sin embargo, la oxidación con cobre genera cambios irreversibles en algunas enzimas como la FBP/SBPasa (Figura 45A), por lo que estos estudios podrían estar afectados por cambios irreversibles (Feng et al., 2013). De forma que la respuesta redox descrita en los mismos podría no corresponderse con la respuesta real y, por tanto, los resultados obtenidos podrían no ser totalmente fiables. En ambas proteínas se observan cambios estructurales debidos a su estado de oxidación (Figuras 45 y 46). La FBPasa activa, en su estado oxidado, presenta un estado dimérico mientras que al reducirse se rompe el puente disulfuro que posibilita dicho estado, provocando una disminución en su actividad. Por el contrario, la FBP/SBPasa adopta formas de elevado peso molecular al inactivarse mediante oxidación. Esto establece una relación entre la actividad de ambas proteínas y las estructuras adoptadas por las mismas.

Los principales cambios estructurales implicados en la adquisición de un estado activo u oxidado en estas proteínas son debidos al establecimiento o rotura de puentes disulfuro. Por tanto, la técnica de doble marcaje empleando NEM (marca las cisteínas reducidas) y posteriormente reducir y unir las cisteínas libres con

MM(PEG)₂₄ (marca las cisteínas inicialmente oxidadas) ha permitido establecer de forma aproximada cuántas cisteínas están implicadas en estos cambios (Figura 54). Además de determinar que coexisten diferentes grados de oxidación en las diferentes condiciones ambientales en ambas proteínas. Así, con un alto grado de reducción (tras añadir 10 mM de DTT) la SBP/FBPasa presenta sus 9 cisteínas reducidas mientras que, al oxidarse un gran número de sus 9 cisteínas, aunque no todas, se oxidan (Figura 54B). Esto indica que en la adquisición de una forma multimerica, están implicadas más de 2 cisteínas (Feng et al., 2013; Cotton et al., 2015). Igualmente, la FBPasa totalmente reducida, pero no totalmente inactiva (Figura 45), presenta sus tres cisteínas reducidas y al oxidarse las 3 cisteínas son susceptibles de esta oxidación (a pesar de que siempre hay una población totalmente reducida) (Figura 54C). Por lo que incluso la cisteína que no está implicada en el puente disulfuro que permite la activación de la FBPasa (Gómez Romero, 2015) es susceptible de oxidación mediante el aire.

Aunque la FBP/SBPasa en oscuridad presenta un mayor grado de oxidación (menor movilidad electroforética) que en condiciones de luz de crecimiento estándar (50 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 55A) y aun mayor que en alta luz (185 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 55B), en ninguna condición presenta una única forma reducida. Por lo que esta enzima nunca se encuentra totalmente reducida en el interior celular y, por tanto, en ninguna de estas condiciones tendría su actividad máxima. Puesto que en dichas condiciones la enzima es activa (Figuras 44 y 65), los diferentes grados de oxidación observados tendrán diferentes niveles de actividad y, por tanto, se establecen puentes disulfuro que no provocan una completa inactivación. En el caso de la FBPasa hay un cambio conformacional similar, presentando un mayor grado de oxidación en oscuridad que en luz de crecimiento estándar y aun mayor que en alta luz (Figura 55C, 55D). Es más, en alta luz aproximadamente la mitad de la enzima se encuentra totalmente reducida. Aunque el porcentaje de reducción de estas enzimas está regulado por la intensidad de luz, este no es completamente oxidado o reducido en ninguna de las condiciones estudiadas, lo que podría permitir una rápida respuesta a las variaciones ambientales transitorias. Por lo que el ciclo de CBB y la ruta OPP podrían adaptarse más rápidamente a cambios en el régimen de luz. De forma que, al no encontrarse totalmente oxidadas o reducidas un leve cambio en estas condiciones será rápidamente seguido de la adaptación en cuanto al estado redox. En ambas enzimas la diferencia en el grado de oxidación entre luz/oscuridad fue mayor que entre luz/alta luz, lo que indica que, aunque las variaciones en la intensidad luminosa desencadenen un cambio en su actividad el principal cambio que sufrirán será en la transición día/noche.

En *Synechocystis* las tiorredoxinas presentan un mayor grado de reducción en luz que en oscuridad, donde principalmente se encuentran oxidadas. La tiorredoxina A de *Synechocystis* es capaz de reducir a ambas FBPasas *in vitro* (Figura 46) generando en ambas enzimas los mismos cambios conformacionales que un reductor artificial como el DTT (Figuras 45 y 46). Además, en un mutante carente de TrxA el estado de oxidación de la FBP/SBPasa y la FBPasa varía (Mallen-Ponce, 2020), lo que indica que es TrxA quien actúa como intermediario entre la luz y la reducción de las FBPasas (Figura 76). Por tanto, sería TrxA reducida por los electrones generados en la cadena de transporte electrónico fotosintética la que actuaría sobre sobre estas enzimas reduciéndolas (inactivando a la FBPasa y activando a la FBP/SBPasa). Estableciendo así el principal sistema de regulación

de estas proteínas, relacionando su actividad con las condiciones externas y permitiendo la rápida adaptación en el flujo del carbono ante diversos cambios. Mediante la valoración redox de ambas enzimas se determinó que presentan un E_{m8} similar (Figura 45B, 45C) al del resto de proteínas del ciclo CBB analizadas en plantas y microalgas como FBPasa, SBPasa fosforibulokinasa, fosfoglicerato quinasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; cuyo E_{m8} oscila entre -335 y -360 (Hirasawa et al., 1999; Balmer et al., 2001; Marri et al., 2009; Morisse et al., 2014). La regulación redox de estas enzimas en plantas y microalgas está relacionada con las tiorredoxinas tipo *m* y *f* (Wolosiuk y Buchanan, 1977; Buchanan et al., 2000; Raines, 2003; Montrichard et al., 2009; Gutle et al., 2016). *Synechocystis* solo presenta una tiorredoxina tipo *m* (TrxA) (Florencio et al., 2006), por lo que la regulación redox de estas enzimas posiblemente la posibilite principalmente TrxA (Mallen-Ponce, 2020). A dicho pH el potencial redox de las tiorredoxinas *f* y *m* de espinaca oscilan entre -340 y -360 mV (Hirasawa et al., 1999), por lo que en estas condiciones este E_{m7} de la tiorredoxina *m* plantas es idéntico al de TrxA de *Anabaena* (Mihara et al., 2020), lo que sugiere que esta regulación redox es posible para ambas enzimas de *Synechocystis*. Las otras tiorredoxinas presentes en *Synechocystis*, TrxB y TrxQ, tienen una baja expresión en la mayoría de las condiciones de cultivo, solo se inducen en determinadas condiciones de estrés y son menos abundantes que TrxA (Pérez-Pérez et al., 2009a). Por tanto, que sea TrxA la tiorredoxina que principalmente generaba un cambio en la actividad tanto de la FBP/SBPasa como de la FBPasa era, en cierto modo, esperable.

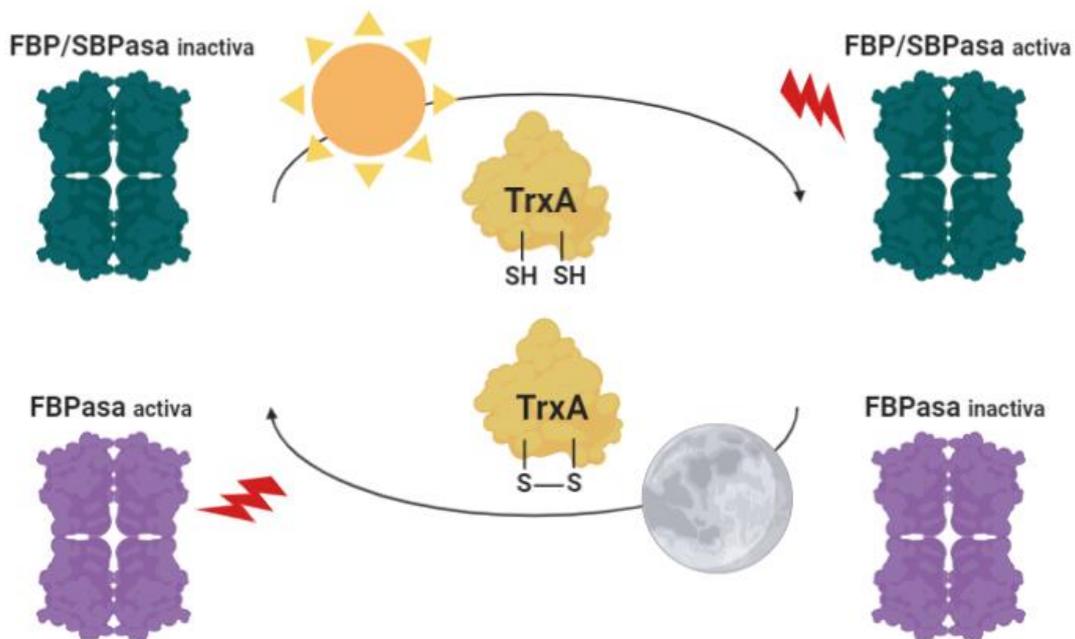


Figura 76. Regulación por luz de las FBPasas de *Synechocystis*. El rayo simboliza el mayor grado de activación de cada enzima.

A pesar de los cambios en los flujos de diferentes rutas de asimilación de la glucosa, como la activación de la ruta OPP donde participa la FBPasa, dependiendo de las condiciones tróficas (Chen et al., 2016; Ueda et al., 2018; Makowka et al., 2020) el estado redox de la FBPasa y la FBP/SBPasa no está regulado por las condiciones tróficas sino por la luz (Figuras 56 y 75). Por tanto, no se observó ningún cambio en

el estado de oxidación de estas enzimas en mixotrofia, fotoheterotrofia o fotoautotrofia (Figura 56). El grado de oxidación de las enzimas en presencia de glucosa solo aumentó en ausencia de luz; oxidación que se potencia en fotoheterotrofia. Esto puede deberse a una adaptación metabólica debida a la presencia de DCMU o a un incremento de moléculas oxidantes que puedan actuar sobre las FBPasas debidas al DCMU.

Incluso tras la adición de DCMU, que impide el flujo lineal de electrones, el grado de oxidación está relacionado con la presencia o ausencia de luz. Por tanto, ya que las células están sometidas a iluminación los fotosistemas pueden excitarse por lo que se generarán reacciones fotoquímicas a pesar de que no exista un flujo lineal de electrones. Esto permite la reducción de la ferredoxina y por consiguiente de las tiorredoxinas y de las dianas de estas. Por consiguiente, se producirá la reducción de la FBPasa y la FBP/SBPasa. Además, incluso en heterotrofia se cree que una de las isoformas de FNR, al poder oxidar NADPH, podría donar este poder reductor a la ferredoxina (Thomas et al., 2006; Korn, 2010; Laughlin et al., 2019). Sin embargo ya que TrxA está oxidada en oscuridad esto no parece ser capaz de producir su reducción (Mallen-Ponce, 2020). También es posible que otras proteínas o moléculas, diferentes a las tiorredoxinas, pueden estar implicadas en la regulación redox de la FBPasa y la FBP/SBPasa tanto en luz como en oscuridad como son las glutarredoxinas o el glutatión.

1.3.1. Regulación específica de la FBP/SBPasa.

Los análisis estructurales de esta proteína señalan la presencia de tres posibles conformaciones. Una conformación dimerica inactiva que posteriormente generaría una estructura tetramérica inactiva, la cual se estabilizaría por AMP. Se cree que estructura inactiva se mantendría mediante el establecimiento de un único puente disulfuro (Feng et al., 2013). Mediante su reducción e interacción con magnesio la forma inactiva sería capaz de pasar a un estado tetramérico activo, estado también obtenido mediante la unión de dos dímeros inactivos reducidos y acomplejados con magnesio. Además, el estado activo sería capaz de pasar al estado inactivo mediante su unión con AMP (Figura 9C), de forma que el intercambio de estados ocurriría con facilidad (Feng et al., 2013). Estudios con los mutantes puntuales de las 9 cisteínas de esta proteína indicaban que serían principalmente las cisteínas 75 y 99 quienes establecerían dicho puente disulfuro inactivante (Feng et al., 2013), sin embargo análisis estructurales determinaron que tanto en un mismo monómero reducido como entre monómeros estas cisteínas eran lejanas, por lo que serían las cisteínas 75 y 84 las posibles candidatas (Cotton et al., 2015). Otros estudios señalan que las cisteínas oxidadas *in vivo* en esta proteína son las cisteínas 75 y 235 (Guo et al., 2014), a pesar de que la cisteína 235, a diferencia de las anteriores, no está conservada en las distintas cianobacterias (Figura 47A).

El estudio de la oxidación de los residuos de cisteína *in vivo* de la FBP/SBPasa determina que hay más de dos cisteínas oxidadas en oscuridad por lo que, aunque podrían ser dos cisteínas exclusivamente quienes principalmente formen un puente disulfuro que diferencie a las dos conformaciones tetraméricas, hay más residuos cuya oxidación ocurre en oscuridad generando un estado con menor actividad (Figura 54). Si solo dos cisteínas estuvieran implicadas en formar un puente disulfuro

intramolecular que produzca el paso de un estado activo a un estado inactivo, la generación de un doble mutante de ambas o un mutante simple de una de ellas debe generar una enzima siempre activa (Feng et al., 2013; Guo et al., 2014; Cotton et al., 2015). Ya que todas las aproximaciones anteriores determinaron que la cisteína 75 era una de las dos cisteínas implicadas en esto un mutante de la misma generaría una proteína siempre activa, sin embargo, este no es el resultado obtenido (Figura 48). Es más, ningún mutante simple (C75S, C84S, C99S) genera una proteína siempre activa (Figura 48), siendo el doble mutante de las cisteínas 75 y 84 el único que origina una enzima menos sensible a la oxidación, pero aun así ligeramente sensible (Figura 49). Ya que la proteína C75SC84S era diferente a la C75S y C84S esto indica que el puente disulfuro que se establece entre estas dos cisteínas puede ser tanto intra como intermolecular. Puesto que C75SC84S no es totalmente insensible a la oxidación deben existir otros residuos de cisteína que pueden ser oxidados y afectar a la actividad de la enzima como sugerían los estudios *in vivo* (Figura 54). Esto se sugería en la valoración redox de la FBP/SBPasa en la que se detectan dos pares redox (Figura 45B), sugiriendo que existen dos puentes disulfuro.

Recién purificadas el estado de oxidación de las proteínas C75S y C84S es mayor que el de la proteína silvestre, sugiriendo que estas cisteínas participan en la protección frente a la oxidación. Sin embargo, esto no sería exclusivo de C75 y C84 ya que C99S, C75SC99S y C84SC99S también presentan una mayor sensibilidad a la oxidación (Figuras 48 y 48). Puesto que la cisteína 99 está localizada cercana al sitio de coordinación con magnesio (Figura 47B) y que un aumento de magnesio no produce un cambio en la actividad de la proteína C99S (Figura 48E) esta cisteína puede estar implicada tanto en la coordinación con el cofactor como en mantener la estructura en la FBP/SBPasa que permite dicha interacción. De forma que, el potenciamiento de este fenotipo en las proteínas C75SC99S y C84SC99S puede deberse a que se ve afectada la coordinación con el magnesio y su susceptibilidad a la oxidación. Por tanto, C85SC99S carecería de actividad porque se obtiene sobreoxidada e inactiva y es incapaz de volver a una conformación activa. Por lo que si las cisteínas 75 y 84 están implicadas en la protección frente a la sobreoxidación la eliminación de una de ellas dificultaría el paso a un estado activo tras la oxidación de la proteína, efecto que se potencia ante la oxidación con cobre (Figuras 48 y 49). Sin embargo, la C75SC84S es menos sensible a la oxidación (Figura 49), lo que sugiere que la falta de ambas cisteínas genera una estructura donde otras de las 7 cisteínas restantes cumplan esta función, o la estructura adoptada por la falta de ambas favorece esta protección.

Las estructuras adoptadas al eliminarse solo la cisteína 75 o 84 son similares entre sí y ricas en oligómeros de alto peso molecular y dímeros, estructuras que se forman en la proteína silvestre al oxidarse y generalmente son inactivas (Figuras 50 y 76) (Feng et al., 2013). Lo que apoya que se favorezca una mayor oxidación ante la ausencia de una de estas cisteínas. Las conformaciones oxidadas de alto peso molecular disminuyen en la proteína C99S, proteína que presenta un patrón de oxidación diferencial. Adoptándose una forma oxidada monomérica que no corresponde con ninguna formada en la FBP/SBPasa silvestre. Por lo que su ausencia favorece la formación de puentes disulfuro intramoleculares aberrantes que generarían una proteína poco activa (Figuras 48 y 50). Posiblemente este cambio está relacionado con la alteración el sitio de interacción con el magnesio.

Puesto que las proteínas analizadas, a excepción de la proteína C84SC99S, eran capaces de adquirir conformaciones diméricas y/o tetraméricas al oxidarse los cambios conformacionales derivados de la oxidación en la FBP/SBPasa no se deben solo a estas tres cisteínas, sino que las 6 cisteínas restantes de la proteína, a pesar de no estar conservadas, participan en la formación de las estructuras oxidadas inactivas (Figuras 50 y 51). C75SC84S, a pesar de presentar una alta actividad cuando está oxidada (Figura 49), adquiere conformaciones oligoméricas (Figura 51) por lo que estas estructuras, aun oxidadas, deben contar con actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa. Debido a la incapacidad de la proteína de formar oligómeros C84SC99S ambas cisteínas podrían estar implicadas en formar los puentes disulfuro que posibilitan la formación de estructuras de elevado peso molecular al inactivarse. Puesto que esta proteína no presenta actividad (Figura 49), estarían no solo implicadas en las estructuras de elevado peso molecular inactivas sino también las activas. Ya que todas las proteínas donde C99 está alterada muestran patrones anómalos de oxidación y actividad (Figuras 48, 49, 50 y 51) probablemente esta cisteína está implicada en la adquisición de una conformación adecuada ante los cambios redox.

Sin embargo, a pesar de tener una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa mayor y menor tendencia a la oxidación (Figura 49), la presencia de la proteína C75SC84S *in vivo* no supone una mejora respecto a una proteína sin alterar (Figura 54), pues la estirpe C75SC84S es indistinguible de la estirpe S/F. Por lo que a esa intensidad luminosa la sobreexpresión de la FBP/SBPasa ya permita el máximo crecimiento posible. Por tanto, para determinar si realmente provoca una mejora sería necesario sustituir la FBP/SBPasa endógena por la versión alterada. Por el contrario, la estirpe C99S presenta una disminución en el crecimiento, así como en la acumulación de glucógeno respecto a la estirpe silvestre. Lo que sugiere la posibilidad de la formación de heterotetrámeros C99S-WT, lo que disminuiría tanto el número de tetrámeros donde todos los monómeros sean silvestres como aquellos donde todos los monómeros sean C99S. Esto produciría, por tanto, una disminución en la actividad de la enzima.

2. Esencialidad de las actividades FBPasa y SBPasa en *Synechocystis*.

2.1. Implicación de ambas actividades en fotoautotrofia y el catabolismo del carbono.

La actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa en *Synechocystis* está catalizada por la enzima FBP/SBPasa mientras que la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa está catalizada por esta enzima y la FBPasa (Gerbling et al., 1986; Tamoi et al., 1996, 1998). Una ausencia de la FBP/SBPasa conlleva la imposibilidad de crecer fotoautotróficamente y, por tanto, la necesidad de una fuente de carbono exógena (Figura 40) (Yan y Xu, 2008). Ya que la estirpe Δ F/S acumula la enzima FBPasa (Figura 40) esta estirpe solo carece de actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa la introducción de una actividad SBPasa se esperaba que pudiera revertir la incapacidad de crecer fotoautotróficamente. Sin embargo, fue necesaria la introducción de la SBPasaAt y de la FBPasaPs para revertir este fenotipo (Figuras 59 y 62). De igual forma a la introducción de la SBPasaAt, la introducción exclusiva

de la FBPasaPs tampoco fue suficiente para revertir este fenotipo (Figura 61). Esto sugiere que, aunque la FBP/SBPasa puede sustituir a la FBPasa en su función en ruta OPP (Figura 40), la FBPasa no puede aportar, en condiciones lumínicas, una actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa suficiente para realizar la fijación de carbono (Figura 59). Posiblemente la ineficacia de la FBPasa se debe tanto a la regulación contraria de ambas enzimas, que haría que la FBPasa esté poco activa en condiciones fotosintéticas (Figuras 45, 46 y 55), a su baja expresión en *Synechocystis* (Tamoi et al., 1998; Guo et al., 2014) y una menor actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa máxima. Por tanto, la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa total sería menor. Además, la necesidad de introducir ambas enzimas cloroplastídicas demuestra que la actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa es necesaria para el crecimiento fotoautotrófico (Figura 61). Sin embargo, aunque las estirpes $\Delta F/S\Delta F+S+F$ y $\Delta F/S+S+F$ son capaces de crecer fotoautotróficamente (Figura 62) solo presentaron una tasa de crecimiento similar a la estirpe silvestre ante bajas intensidades luminosas ($5 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), pero cuando la intensidad luminosa aumentó la tasa de crecimiento de estas estirpes disminuyó, ocasionando, en el caso de la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S+F$, incluso la inhibición del crecimiento de la misma en alta luz. Esto sugiere que la actividad de las enzimas cloroplastídicas en *Synechocystis* es ineficiente. Ya que la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de las estirpes S+F sufre una limitación mayor que la de la estirpe silvestre ante bajas cantidades de magnesio este puede ser uno de los motivos de una menor actividad en estas estirpes *in vivo* (Figura 65).

La expresión de la SBPasaAt mejoró el crecimiento en fotoheterotrofia y mixotrofia en baja luz de las estirpes S y $\Delta F+S$ (Figura 60) que crecieron más rápidamente que la estirpe silvestre, pero no llegó a la tasa de crecimiento de la estirpe $\Delta F/S$. Por tanto, su expresión produce una mejora en el crecimiento con glucosa exógena en condiciones donde las rutas del catabolismo de la glucosa están activas. Sin embargo, su expresión en un mutante carente de la enzima FBP/SBPasa afectó negativamente al crecimiento, puesto que el mutante $\Delta F/S+S$ crece más lentamente que la estirpe $\Delta F/S$ en estas condiciones. No obstante, la estirpe $\Delta F/S+S$ tiene un mayor tiempo de supervivencia en fotoautotrofia que la estirpe $\Delta F/S$, por lo que el metabolito acumulado en la estirpe $\Delta F/S$ debe ser susceptible de metabolización por la SBPasaAt. Ya que la mejora en el crecimiento de la estirpe $\Delta F/S$ probablemente se debe a una redirección de los intermediarios compartidos por la ruta CBB a la ruta OPP o glucólisis, posiblemente la expresión de la SBPasaAt favorezca la redirección de nuevo de estos esqueletos carbonados para la fijación de carbono (Figura 76). Puesto que las SBPasas presentan una mínima actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa y proceden de un ancestro común con la FBPasa (Jiang et al., 2012b; Gutle et al., 2016), posiblemente su expresión también potencie en determinadas condiciones la ruta OPP (Figuras 59 y 65). El retraso en el crecimiento en alta luz y condiciones fotoautotróficas de la estirpe S sugiere que la expresión de la SBPasaAt debe estar interfiriendo con el correcto funcionamiento de la fijación de carbono. Puesto que en la estirpe $\Delta F+S$ este retraso en el crecimiento no sucede (Figura 63) apoya que no es un problema debido al exceso de actividad sedoheptulosa-1, 7-bisfosfatasa respecto a la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa, sino que la SBPasaAt también podría potenciar la entrada de fructosa-1, 6-bisfosfato en la ruta OPP. En condiciones de alta luz, donde la principal ruta del carbono activa debería ser CBB

conllevaría una pérdida de carbono. Esto sugiere que la expresión conjunta de SBPasaAt y FBPasaPs genera un desequilibrio general sobre los flujos del carbono.

Contrario al efecto de la expresión de la SBPasaAt, la expresión de la FBPasaPs ejerce un efecto negativo en el crecimiento en fotoheterotrofia y mixotrofia (Figura 61). Así, la estirpe F crece más lentamente en estas condiciones que la estirpe silvestre. Este efecto también está presente en la estirpe $\Delta F/S+F$, cuya tasa de crecimiento disminuye hasta niveles similares a los de la estirpe silvestre en presencia de glucosa (Figura 61). Siendo inferior el crecimiento al de la estirpe $\Delta F/S+S$ (Figura 59). Esto sugiere que, a diferencia de la FBPasa de *Synechocystis*, la FBPasaPs está altamente especializada en su contribución en el ciclo de CBB. Por tanto, no favorece el catabolismo de la glucosa e incluso favorecería la redirección de esqueletos carbonados a la fijación de carbono a pesar de la imposibilidad de que esta ruta se complete. Ya que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+F$ segrega en ausencia de la FBPasa cianobacteriana esta enzima cloroplastídica debe poder contribuir a la ruta OPP (Figuras 60 y 61). Sin embargo, ya que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+F$ crece más lentamente que la estirpe $\Delta F/S\Delta F+S$ en mixotrofia su contribución en el catabolismo de la glucosa es menor que la de la SBPasaAt (Figuras 60 y 61). Puesto que el aumento de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa producido por enzima es mayor que el debido a la SBPasaAt (un 37% frente a un 18%), en condiciones de magnesio ideales, gran parte de esta actividad no parece ser empleada para obtener poder reductor a partir de la glucosa (Figura 65). Por otro lado, el crecimiento de la estirpe F está favorecido en alta luz, a unos niveles similares a los de la estirpe S/F (Figura 64). Esto indica que, al igual que la FBP/SBPasa, la FBPasaPs está implicada principalmente en la fijación de carbono y esto es lo que produce una mejora en el crecimiento de la misma (Nakajima et al., 2014; García-Cañas, 2015; Ueda et al., 2018).

La SBPasaAt y la FBPasaPs generan alteraciones en el ciclo del carbono contrarias entre sí. Es por esto que la estirpe S+F presenta una velocidad de crecimiento similar al de la estirpe silvestre en alta luz (Figura 76). Por tanto, la expresión de ambas es necesaria para obtener de nuevo un equilibrio en las diferentes rutas del carbono en las que está implicada la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa. Además, ambas son necesarias para recuperar el crecimiento fotoautotrófico de la estirpe $\Delta F/S$.

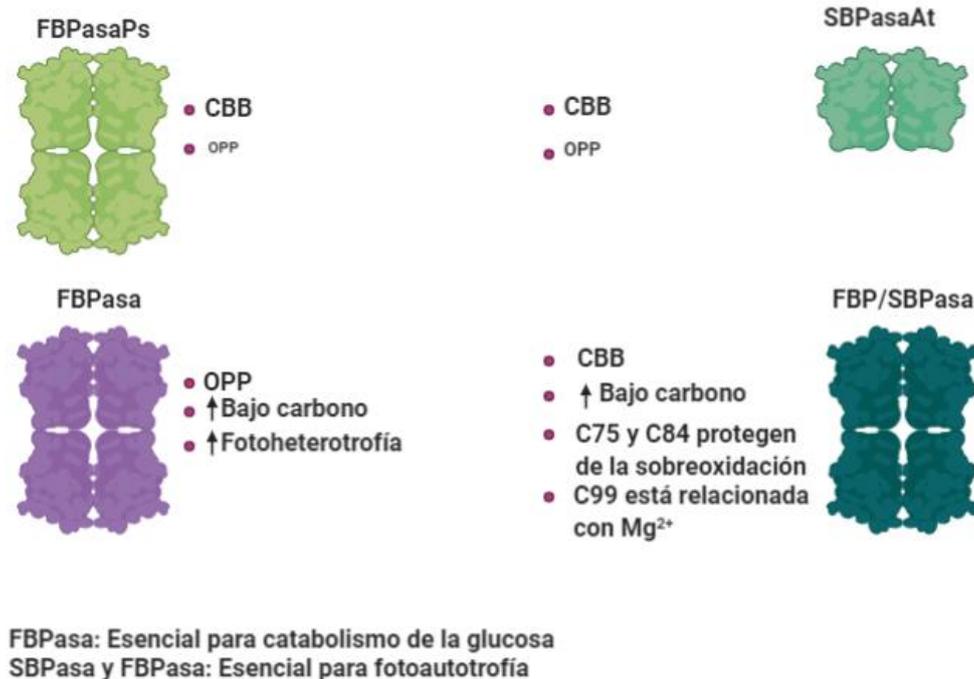


Figura 77. Resumen de las características de las diferentes enzimas con actividad FBPasa en *Synechocystis*. Las flechas indican un aumento de la cantidad de proteína en determinadas condiciones de crecimiento mientras que el tamaño de letra refleja la implicación de cada proteína en una ruta.

2.2. Diferencias en la regulación redox en *Synechocystis* y plantas.

En condiciones no reductoras la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa tanto de las estirpes complementadas $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S\Delta F+S+F$ como de las estirpes S, F y S+F fue mayor que las estirpes silvestre y S/F. Debido a la baja actividad de la FBPasa la actividad en condiciones no reductoras de $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S\Delta F+S+F$ fue muy similar (Figura 65). Esto indica que la FBP/SBPasa de *Synechocystis* se oxida totalmente al agitar las muestras en este método experimental mientras que las enzimas de plantas son menos susceptibles a la oxidación. Por lo que probablemente, en oscuridad o baja luz, la FBPasaPs y la SBPasaAt en *Synechocystis* estén más activas de lo que puedan estar las FBPasas de cianobacteria. Este fenómeno puede deberse a una mayor resistencia a la oxidación o a que exista un sistema de oxidación enzimática específico en plantas que no existe en cianobacterias (Jacquot, 2018; Ojeda et al., 2018b). Aunque el requerimiento de magnesio de las enzimas de plantas es mayor (Figura 65), de forma que posiblemente la actividad de ambas *in vivo* sea menor debido a una limitación de magnesio. En las plantas la fijación de carbono está aislada de otras rutas metabólicas en el cloroplasto, una compartimentalización que no ocurre en cianobacterias. Por tanto, en cianobacterias un aumento en la concentración de magnesio supondría un aumento del mismo en toda la célula y no simplemente la entrada de este a un compartimento de la misma. En condiciones reductoras la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa debida a la FBPasaPs y la SBPasaAt aumentó con una menor dependencia de la concentración de magnesio lo que sugiere que el requerimiento de este cofactor depende de la conformación adoptada por las enzimas (Gutle et al., 2016). En condiciones reductoras y no reductoras, la actividad

fructosa-1, 6-bisfosfatasa de las estirpes $\Delta F/S+S+F$ y $\Delta F/S\Delta F+S+F$ es limitada y está muy controlada por el magnesio disponible, necesitándose elevadas concentraciones para igualar a la de la estirpe silvestre. Esta actividad es entre un 20 y un 25% inferior en condiciones reductoras y superior a la de la estirpe silvestre en condiciones no reductoras con una concentración igual o superior a 75 mM de magnesio. Esta menor actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa provoca una disminución en su capacidad fotosintética (Figura 68), posiblemente por un ciclo de CBB menos eficiente.

En plantas la principal tiorredoxina implicada en la regulación redox de estas dos enzimas es la tiorredoxina tipo *f*, que constituye su principal donador de electrones (Yoshida et al., 2015; Gutle et al., 2016; Fernández-Trijueque et al., 2019). Sin embargo, las cianobacterias no cuentan con un homólogo de este tipo de tiorredoxinas como sí que ocurre con las tipo *m*, *x* e *y* (Florencio et al., 2006). La menor capacidad fotosintética y menor tasa de crecimiento (Figuras 67 y 68), unida a la falta de tiorredoxinas tipo *f*, sugiere que el sistema de regulación redox de *Synechocystis* (probablemente TrxA) no es capaz de reducir eficientemente a la FBPasaPs y la SBPasaAt, pese a ser capaz de provocar la reducción parcial de la FBPasaPs en luz (Figura 69). Así, el grado de reducción de la FBPasaPs en la estirpe $\Delta F/S+S+F$ es mayor en luz que en oscuridad, indicando esto que las tiorredoxinas de cianobacteria también pueden tener como diana enzimas de planta por su similitud con las FBPasas propias de *Synechocystis*. Por lo que a pesar de que la tiorredoxina tipo *m* de plantas no muestra una gran especificidad por la FBPasa cloroplastídica *in vitro* (Gutle et al., 2016) esta especificidad *in vivo* y con la tiorredoxina de *Synechocystis*, debe ser mayor.

La introducción de la tiorredoxina *f1* de *A. thaliana*, conjuntamente con el sistema SBPasa/FBPasa cloroplastídico, generó una mejora en el crecimiento en alta luz (Figura 67). Pese a la presencia en *Synechocystis* de otras enzimas que podrían ser una diana de esta tiorredoxina, las estirpes que expresan solo la tiorredoxina *f* no presentaron ningún fenotipo o una mejora de la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa (Figuras 63, 67 y 68). Ya que no hay cambios en la eficiencia fotosintética o el crecimiento, si actuase sobre enzimas de la cianobacteria estas no estarían implicadas en la fotosíntesis o la fijación del carbono. Las cianobacterias no cuentan con la compartimentalización típica de células eucariotas, por lo que no es posible descartar que *Synechocystis* cuente con otros mecanismos de regulación para mantener el estado de oxidación adecuado de las proteínas del metabolismo central del carbono y, por tanto, aunque la tiorredoxina *f1* fuera capaz de actuar sobre ellas este mecanismo provocaría que la proteína volviera al estado redox adecuado dependiendo de las condiciones ambientales. La estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ presenta una mayor actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa en condiciones reductoras que la estirpe $\Delta F/S+S+F$, una mayor capacidad fotosintética (Figura 68) y un mayor porcentaje de reducción de FBPasaPs en luz (Figura 69). Por tanto, la introducción de la tiorredoxina *f1* aumentó la actividad de esta enzima y, probablemente también de la SBPasaAt. Por lo que el incremento en el grado de reducción de la FBPasaPs debido a la tiorredoxina de planta fue suficiente para crecer eficientemente en alta luz (Figuras 68 y 69). El aumento en la actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa de $\Delta F/S+S+F+TrxF$ se debe a un aumento de la reducción de la FBPasa cloroplastídica y a un ligero aumento en la cantidad de la enzima, respecto a $\Delta F/S+S+F$ (Figuras 68 y 69). Hay algunos estudios que señalan a las tiorredoxinas tipo *f* como posibles

chaperonas (Sanz-Barrio et al., 2012; Du et al., 2015), de forma que es posible que este aumento en la cantidad de FBPasaPs observado ante la expresión de la tiorredoxina esté relacionado con esta función. Puesto que ante un mayor grado de reducción la acumulación de esta proteína es también mayor es posible que su reducción aumente la estabilidad de la proteína o dificulte su degradación. Sin embargo, generalmente los puentes disulfuro aumentan la estabilidad de las proteínas (Beeby et al., 2005; Khoo y Norton, 2011; Dombkowski et al., 2014) lo que sugiere que este no sería el motivo en el aumento de la cantidad de FBPasaPs. Además, esta estirpe presenta una menor necesidad de magnesio para alcanzar su máxima actividad fructosa-1, 6-bisfosfatasa, lo que correlaciona con que el requerimiento de magnesio de las enzimas cloroplastídicas varía dependiendo del grado de reducción de las mismas (Gutle et al., 2016).

El grado de reducción de las tiorredoxinas cianobacterianas en el interior de la misma cambia de forma dependiente de la intensidad de la luz de crecimiento de las mismas (Mallen-Ponce, 2020). El estado de reducción en *Synechocystis* de la tiorredoxina *f1* de *A. thaliana* también varía dependiendo de la presencia o ausencia de luz. Así, al aumentar la luz de crecimiento su grado de reducción aumenta (Figura 70). Esto, unido al aumento de la eficiencia en la estirpe $\Delta F/S+S+F+TrxF$ indica que la FTR de cianobacteria es capaz de reducirla eficientemente mediante la cesión de electrones a la tiorredoxina de plantas.

Independientemente de las diferencias estructurales, los diferentes orígenes evolutivos y las diferentes adaptaciones de cada organismo las enzimas FBPasa y SBPasa de plantas son intercambiables con la enzima de cianobacteria. Además, aunque no de una forma totalmente eficiente, el sistema redox de cianobacteria es capaz de regular la actividad de las mismas de forma dependiente de luz. Del mismo modo, el sistema redox de cianobacterias es capaz de donar electrones a tiorredoxinas que no están presentes en cianobacterias. Estos datos demuestran que, a pesar de las diferencias, hay una gran similitud entre los componentes reguladores y del ciclo del carbono de plantas y cianobacterias. Esto permite crear un sistema simple para estudiar la regulación redox de enzimas de planta por lo diferentes componentes de las mismas (tanto tiorredoxinas como otras proteínas o agentes reductores y oxidantes) y evitar así problemas debidos a la redundancia de las diferentes isoformas presentes en plantas. La obtención de mutantes en cianobacteria es más sencilla y requiere menos tiempo que en plantas por lo que, para estudiar la regulación de cualquier otro componente o ruta de plantas podría crearse el mutante de dicho componente en *Synechocystis* o generar un mutante con expresión regulada (Mallen-Ponce, 2020). Por tanto, mediante la introducción de la enzima a estudiar sobre un fondo TrxF y la eliminación del homólogo de *Synechocystis* mediante los métodos empleados en esta tesis podría estudiarse si este componente es susceptible de regulación mediada por la tiorredoxina *f1*. De la misma forma podría generarse una estirpe que expresase cualquier otra tiorredoxina o proteína reguladora y estudiar el efecto de esta. Esto permitiría no solo un estudio *in vivo* más rápido, sino que además posibilitaría estudiar solo el efecto directo de dicho componente.

Conclusiones

1. Se ha identificado el sistema de regulación del intercambio *petJ/petE* en cianobacterias que está formado por los genes *petRP*.
2. PetR es un regulador transcripcional que mediante su unión, independiente de cobre, a los promotores de los genes *petJ* (que codifica para Cit c_6), *slr0601* activa su expresión y mediante su unión al promotor del gen *petE* (que codifica para Pc) reprime su represión.
3. PetP es una proteasa que provoca el corte y degradación de PetR en respuesta a cobre.
4. Las histidinas H150 y H154 de PetP son esenciales para su actividad proteasa.
5. Las metioninas M53 y M58 de PetP están implicadas en su capacidad de detección de cobre.
6. Los niveles de Cit c_6 y Pc presentan una regulación postranscripcional dependiente de la disponibilidad de cobre.
7. Una acusada disminución en los niveles de Cit c_6 cuando no hay cobre disponible y de Pc con cobre disponible en el medio afecta negativamente a la capacidad fotosintética de *Synechocystis*.
8. El funcionamiento del sistema PetR-PetP está conservado en *Anabaena* y *Synechocystis*.
9. Las enzimas FBPasa y FBP/SBPasa presentan una regulación redox inversa; la FBPasa oxidada es activa, mientras que la FBP/SBPasa en su forma reducida es activa.
10. El estado redox de la FBPasa y FBP/SBPasa no se regula por la disponibilidad de glucosa sino mediante los ciclos luz/oscuridad y la intensidad de luz.
11. Los residuos C75 y C84 de la FBP/SBPasa cumplen un papel central en su regulación redox mientras que C99 puede cumplir una función estructural.
12. La enzima FBP/SBPasa participa en el ciclo CBB mientras que la enzima FBPasa participa en el ciclo OPP.
13. la enzima FBP/SBPasa es esencial para el crecimiento fotoautotrófico.
14. La existencia de una actividad FBPasa es necesaria para el crecimiento mixotrófico y heterotrófico.
15. El sistema redox de cianobacteria es capaz de alterar el estado de redox, dependiendo de las condiciones ambientales, de la FBPasa cloroplastídica de planta (posiblemente también sobre la SBPasa) y la tiorredoxina *f1* de *A. thaliana*.

Bibliografía

- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., y Wikström, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat. Struct. Biol.* 7, 910-917.
- Adir, N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: Reconstructing a giant. *Photosynth. Res.* 85, 15-32.
- Alcott, L.J., Mills, B.J.W., y Poulton, S.W. (2019). Stepwise Earth oxygenation is an inherent property of global biogeochemical cycling.
- Amoroso, A., Boudet, J., Berzigotti, S., Duval, V., Teller, N., Mengin-Lecreulx, D., Luxen, A., Simorre, J.P., y Joris, B. (2012). A peptidoglycan fragment triggers β -lactam resistance in *Bacillus licheniformis*. *PLoS Pathog.* 8.
- Anderson, L.E. (1971). Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim. Biophys. Acta* 235, 237-244.
- Andersson, I., y Backlund, A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 275-291.
- Andrei, A., Öztürk, Y., Khalfaoui-Hassani, B., Rauch, J., Marckmann, D., Trasnea, P.I., Daldal, F., y Koch, H.G. (2020). Cu homeostasis in bacteria: The ins and outs. *Membranes (Basel)*. 10, 1-45.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., y Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215-237.
- Archibald, J.M. (2009). The Puzzle of Plastid Evolution. *Curr. Biol.* 19, R81-R88.
- Ardelean, I., Matthijs, H.C., Havaux, M., Joset, F., y Jeanjean, R. (2002). Unexpected changes in photosystem I function in a cytochrome c6 -deficient mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 113-119.
- Arêde, P., Milheiriço, C., de Lencastre, H., y Oliveira, D.C. (2012). The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the mecA repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* 8, 13.
- Arêde, P., Ministro, J., y Oliveira, D.C. (2013). Redefining the role of the β -lactamase locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: β -lactamase regulators disrupt the mec-mediated strong repression on mecA and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3037-3045.

- Argüello, J.M., González-Guerrero, M., y Raimunda, D. (2011). Bacterial transition metal P(1B)-ATPases: transport mechanism and roles in virulence. *Biochemistry* 50, 9940-9949.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., y Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 44, W344-W350.
- Badarau, A., y Dennison, C. (2011). Thermodynamics of copper and zinc distribution in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13007-13012.
- Badarau, A., Baslé, A., Firbank, S.J., y Dennison, C. (2013). Investigating the role of zinc and copper binding motifs of trafficking sites in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochemistry* 52, 6816-6823.
- Ball, S.G., y Morell, M.K. (2003). From Bacterial Glycogen to Starch : Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 207-233.
- Balmer, Y., Stritt-Etter, A.L., Hirasawa, M., Jacquot, J.P., Keryer, E., Knaff, D.B., y Schürmann, P. (2001). Oxidation-reduction and activation properties of chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase with mutated regulatory site. *Biochemistry* 40, 15444-15450.
- Balsera, M., Uberegui, E., Susanti, D., Schmitz, R.A., Mukhopadhyay, B., Schürmann, P., y Buchanan, B.B. (2013). Ferredoxin:thioredoxin reductase (FTR) links the regulation of oxygenic photosynthesis to deeply rooted bacteria. *Planta* 237, 619-635.
- Battchikova, N., Eisenhut, M., y Aro, E.M. (2011). Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1807, 935-944.
- Bauwe, H., Hagemann, M., y Fernie, A.R. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.* 15, 330-336.
- Becker, G., Klauk, E., y Hengge-Aronis, R. (1999). Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6439-6444.
- Beeby, M., O'Connor, B.D., Ryttersgaard, C., Boutz, D.R., Perry, L.J., y Yeates, T.O.

- (2005). The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol.* 3, 1549-1558.
- Belluzo, B.S., Abriata, L.A., Giannini, E., Mihovilcevic, D., Dal Peraro, M., y Llarrull, L.I. (2019). An experiment-informed signal transduction model for the role of the *Staphylococcus aureus* MecR1 protein in β -lactam resistance. *Sci. Rep.* 9, 1-15.
 - Bendall, D.S., y Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. *BBA - Bioenerg.* 1229, 23-38.
 - Benkovic, S.J., y deMaine, M.M. (1982). Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 53, 45-82.
 - Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van, S.J., Rabinowitz, J.D., Circle, W., y Diego, S. (2010). Absolute Metabolite Concentrations and Implied Enzyme Active Site Occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* 5, 593-599.
 - Berla, B.M., y Pakrasi, H.B. (2012). Upregulation of plasmid genes during stationary phase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, a cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5448-5451.
 - Berzigotti, S., Benlafya, K., S epulchre, J., Amoroso, A., y Joris, B. (2012). *Bacillus licheniformis* BlaR1 L3 loop is a zinc metalloprotease activated by self-proteolysis. *PLoS One* 7, 1-10.
 - Bes, M.T., Hernández, J.A., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2001). Cloning, overexpression and interaction of recombinant Fur from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 with isiB and its own promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 187-192.
 - Blankenship, R.E. (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33, 91-111.
 - Botello-Morte, L., Bes, M.T., Heras, B., Fernández-Otal,  ., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2013). Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: Disulfide Reductase Activity Based on Its CXXC Motifs. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1396-1406.
 - Bradford, M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Buchanan, B.B., Grussem, W., y Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.
- Buey, R.M., Arellano, J.B., López-Maury, L., Galindo-Trigo, S., Velázquez-Campoy, A., Revuelta, J.L., De Pereda, J.M., Florencio, F.J., Schürmann, P., Buchanan, B.B., et al. (2017a). Unprecedented pathway of reducing equivalents in a diflavin-linked disulfide oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 12725-12730.
- Buey, R.M., Galindo-Trigo, S., López-Maury, L., Velázquez-Campoy, A., Revuelta, J.L., Florencio, F.J., de Pereda, J.M., Schürmann, P., Buchanan, B.B., y Balsera, M. (2017b). A New Member of the Thioredoxin Reductase Family from Early Oxygenic Photosynthetic Organisms. *Mol. Plant* *10*, 212-215.
- Buey, R.M., Fernández-Justel, D., González-Holgado, G., Martínez-Júlvez, M., González-López, A., Velázquez-Campoy, A., Medina, M., Buchanan, B.B., y Balsera, M. (2021). Unexpected diversity of ferredoxin-dependent thioredoxin reductases in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 1-12.
- Burnap, R., Hagemann, M., y Kaplan, A. (2015). Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Life* *5*, 348-371.
- Burnap, R.L., Troyan, T., y Sherman, L.A. (1993). The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiol.* *103*, 893-902.
- Cai, Y., y Wolk, P. (1990). Use of a Conditionally Lethal Gene in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 To Select for Double Recombinants and To Entrap Insertion Sequences. *J. Bacteriol.* *172*, 3138-3145.
- Cai, F., Menon, B.B., Cannon, G.C., Curry, K.J., Shively, J.M., y Heinhorst, S. (2009). The pentameric vertex proteins are necessary for the icosahedral carboxysome shell to function as a CO₂ leakage barrier. *PLoS One* *4*.
- Cai, F., Bernstein, S.L., Wilson, S.C., y Kerfeld, C.A. (2016). Production and Characterization of Synthetic Carboxysome Shells with Incorporated Luminal Proteins. *Plant Physiol.* *170*, 1868-1877.
- Camsund, D., y Lindblad, P. (2014). Engineered transcriptional systems for cyanobacterial biotechnology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *2*, 40.

- Carrasco, J.L., Chueca, A., Prado, F.E., Hermoso, R., Lfizaro, J.J., Ramos, J.L., y Sahrawy, M. (1994). Cloning, structure and expression of a pea cDNA clone coding for a photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase with some features different from those of the leaf chloroplast enzyme. *Planta* 193, 494-501.
- Carretto, E., Visiello, R., y Nardini, P. (2002). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Prog.* 85, 57-72.
- Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., y Andrews, S.C. (2006). Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals an Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 19, 143-157.
- Casella, S., Huang, F., Mason, D., Zhao, G.Y., Johnson, G.N., Mullineaux, C.W., y Liu, L.N. (2017). Dissecting the Native Architecture and Dynamics of Cyanobacterial Photosynthetic Machinery. *Mol. Plant* 10, 1434-1448.
- Cejudo, F.J., Ojeda, V., Delgado-Requerey, V., González, M., y Pérez-Ruiz, J.M. (2019). Chloroplast Redox Regulatory Mechanisms in Plant Adaptation to Light and Darkness. *Front. Plant Sci.* 10, 380.
- Cha, J., Vakulenko, S.B., y Mobashery, S. (2007). Characterization of the β -lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 46, 7822-7831.
- Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., D. Lemaire, S., y Decottignies, P. (2015). First Proteomic Study of S - Glutathionylation in Cyanobacteria. *J. Proteome Res.* 14, 59-71.
- Charles, S.A., y Halliwell, B. (1981). Light Activation of Fructose Bisphosphatase in Isolated Spinach Chloroplasts and Deactivation by Hydrogen Peroxide. *Planta* 151, 242-246.
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A., y Van Arkel, G.A. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet. MGG* 204, 185-191.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R., Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., et al. (2016). The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 5441-5446.

- Cheng, D., y He, Q. (2014). PfsR Is a Key Regulator of Iron Homeostasis in *Synechocystis* PCC 6803. PLoS One 9, e101743.
- Chiadmi, M., Navaza, A., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J.P., y Cherfils, J. (1999). Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. EMBO J.
- Choe, J.Y., Poland, B.W., Fromm, H.J., y Honzatko, R.B. (1998). Role of a dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. Biochemistry 37, 11441-11450.
- Choe, J.Y., Fromm, H.J., y Honzatko, R.B. (2000). Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. Biochemistry 39, 8565-8574.
- Cobine, P., Wickramasinghe, W.A., Harrison, M.D., Weber, T., Solioz, M., y Dameron, C.T. (1999). The Enterococcus hirae copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. FEBS Lett. 445, 27-30.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol. Rev. 9, 1-27.
- Cooley, J.W., y Vermaas, W.F.J. (2001). Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Capacity comparisons and physiological function. J. Bacteriol. 183, 4251-4258.
- Cotton, C., Kabasakal, B., Miah, N., y Murray, J. (2015). Structure of the dual-function fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from *Thermosynechococcus elongatus* bound with sedoheptulose-7-phosphate. Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun. 71, 1341-1345.
- Couturier, J., Chibani, K., Jacquot, J.P., y Rouhier, N. (2013). Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. Front. Plant Sci. 4, 1-7.
- Crichton, R.R., y Pierre, J.L. (2001). Old iron, young copper: From Mars to Venus. BioMetals 14, 99-112.
- Daie, J. (1993). Cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. Photosynth. Res. 38, 5-14.

- Daley, S.M.E., Kappell, A.D., Carrick, M.J., y Burnap, R.L. (2012). Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and α-ketogutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One* 7, 1-10.
- Delany, I., Rappuoli, R., y Scarlato, V. (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 52, 1081-1090.
- Dennison, C., David, S., y Lee, J. (2018). Bacterial copper storage proteins. *J. Biol. Chem.* 293, 4616-4627.
- DeRuyter, Y.S., y Fromme, P. (2008). The cyanobacteria: molecular biology, genomics, and evolution (Caister Academic Press; Norfolk (UK): Horizon Scientific Press).
- Deschoenmaeker, F., Mihara, S., Niwa, T., Taguchi, H., Wakabayashi, K.-I., y Hisabori, T. (2018). The Absence of Thioredoxin m1 and Thioredoxin C in *Anabaena* sp. PCC 7120 Leads to Oxidative Stress. *Plant Cell Physiol.* 59, 2432-2441.
- Díaz-Troya, S., López-Maury, L., Sánchez-Riego, A.M., Roldán, M., y Florencio, F.J. (2014). Redox regulation of glycogen biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Analysis of the AGP and glycogen synthases. *Mol. Plant* 7, 87-100.
- Doello, S., Klotz, A., Makowka, A., Gutekunst, K., y Forchhammer, K. (2018). A specific glycogen mobilization strategy enables rapid awakening of dormant cyanobacteria from chlorosis. *Plant Physiol.* 177, 594-603.
- Dombkowski, A.A., Sultana, K.Z., y Craig, D.B. (2014). Protein disulfide engineering. *FEBS Lett.* 588, 206-212.
- Donahue, J.L., Bownas, J.L., Niehaus, W.G., y Larson, T.J. (2000). Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1,6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 5624-5627.
- Driever, S.M., Simkin, A.J., Alotaibi, S., Fisk, S.J., Madgwick, P.J., Sparks, C.A., Jones, H.D., Lawson, T., Parry, M.A.J., Raines, C.A., et al. (2017). Increased SBPase activity improves photosynthesis and grain yield in wheat grown in greenhouse conditions. *Plant Physiol.* 167.
- Du, H., Kim, S., Hur, Y.S., Lee, M.S., Lee, S.H., y Cheon, C.I. (2015). A cytosolic thioredoxin acts as a molecular chaperone for peroxisome matrix proteins as well as

- antioxidant in peroxisome. *Mol. Cells* 38, 187-194.
- Dühning, U., Axmann, I.M., Hess, W.R., y Wilde, A. (2006). An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7054-7058.
 - Dunford, R.P., Catley, M.A., Raines, C.A., Lloyd, J.C., y Dyer, T.A. (1998a). Purification of active chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*
 - Dunford, R.P., Durrant, M.C., Catley, M.A., y Dyer, T.A. (1998b). Location of the redox-active cysteines in chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase indicates that its allosteric regulation is similar but not identical to that of fructose-1,6-bisphosphatase. *Photosynth. Res.* 58, 221-230.
 - Durán, R. V. (2005). Análisis de la transferencia electrónica in vivo mediada por plastocianina y citocromo c6 en cianobacterias.
 - Durán, R. V., Hervás, M., De La Rosa, M.A., y Navarro, J.A. (2004). The Efficient Functioning of Photosynthesis and Respiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Strictly Requires the Presence of either Cytochrome c6 or Plastocyanin. *J. Biol. Chem.* 279, 7229-7233.
 - Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A., y Hagemann, M. (2008). The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17199-17204.
 - el-Maghrabi, M.R., Gidh-Jain, M., Austin, L.R., y Pilkis, S.J. (1993). Isolation of a human liver fructose-1,6-bisphosphatase cDNA and expression of the protein in *Escherichia coli*. Role of ASP-118 and ASP-121 in catalysis. *J. Biol. Chem.* 268, 9466-9472.
 - Elhai, J., y Wolk, C.P.B.T.-M. in E. (1988). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. In *Cyanobacteria*, (Academic Press), pp. 747-754.
 - Elhai, J., Vepritskiy, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Wolk, C.P. (1997). Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179, 1998-2005.
 - Ermakova, M., Huokko, T., Richaud, P., Bersanini, L., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J.,

- Peltier, G., y Allahverdiyeva, Y. (2016). Distinguishing the roles of thylakoid respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* *171*, 1307-1319.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V. (1999). Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J. Bacteriol.* *181*, 6223 LP - 6229.
 - Esteves-Ferreira, A.A., Cavalcanti, J.H.F., Vaz, M.G.M.V., Alvarenga, L. V, Nunes-Nesi, A., y Araújo, W.L. (2017). Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. *Genet. Mol. Biol.* *40*, 261-275.
 - Feng, L., Sun, Y., Deng, H., Li, D., Wan, J., Wang, X., Wang, W., Liao, X., Ren, Y., Hu, X., et al. (2013). Structural and biochemical characterization of fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechocystis* strain 6803. *FEBS J.* *281*, 916-926.
 - Fernández-Trijueque, J., Serrato, A.-J., y Sahrawy, M. (2019). Proteomic Analyses of Thioredoxins f and m *Arabidopsis thaliana* Mutants Indicate Specific Functions for These Proteins in Plants. *Antioxidants* *8*, 54.
 - Ferreira, F., y Straus, N.A. (1994). Iron deprivation in cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* *6*, 199-210.
 - Fillat, M.F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* *546*, 41-52.
 - Finazzi, G., Sommer, F., y Hippler, M. (2005). Release of oxidized plastocyanin from photosystem I limits electron transfer between photosystem I and cytochrome b6f in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7031-7036.
 - Fischer, W.W., Hemp, J., y Johnson, J.E. (2016a). Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* *44*, 647-683.
 - Fischer, W.W., Hemp, J., y Valentine, J.S. (2016b). How did life survive Earth's great oxygenation? *Curr. Opin. Chem. Biol.* *31*, 166-178.
 - Florencio, F.J., Pérez-Pérez, M.E., López-Maury, L., Mata-Cabana, A., y Lindahl, M. (2006). The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosynth. Res.* *89*, 157-171.
 - Flores, E., y Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation

- in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39-50.
- Flores, E., y Wolk, C.P. (1985). Identification of facultatively heterotrophic, N₂-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* 162, 1339-1341.
 - Flores, E., Frías, J.E., Rubio, L.M., y Herrero, A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83, 117-133.
 - Forcada-Nadal, A., Llácer, J.L., Contreras, A., Marco-Marín, C., y Rubio, V. (2018). The PII-NAGK-PipX-NtcA regulatory axis of cyanobacteria: A tale of changing partners, allosteric effectors and non-covalent interactions. *Front. Mol. Biosci.* 5, 1-18.
 - La Forge, F.B. (1920). Sedoheptose, a new sugar from sedium spectabile II. *J. Franklin Inst.* 61-77.
 - Foster, A.W., Patterson, C.J., Pernil, R., Hess, C.R., y Robinson, N.J. (2012). Cytosolic Ni(II) sensor in cyanobacterium: Nickel detection follows nickel affinity across four families of metal sensors. *J. Biol. Chem.* 287, 12142-12151.
 - Fraenkel, D.G., Pontremoli, S., y Horecker, B.L. (1966). The specific fructose diphosphatase of *Escherichia coli*: properties and partial purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 114, 4-12.
 - Fu, J., y Xu, X. (2006). The functional divergence of two glgP homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 260, 201-209.
 - Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., y Feng, Y. (2018). Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Front. Plant Sci.* 9, 1-7.
 - García-Cañas, R.M. (2015). Regulación redox de la Fructosa 1, 6 bifosfatasa en la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803. Universidad de Sevilla.
 - García-Cañas, R.M. (2016). Caracterización funcional de la fructosa-1,6/sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa de *Synechocystis* sp PCC 6803. Universidad de Sevilla.
 - García-Cañas, R., Giner-Lamia, J., Florencio, F.J., y López-Maury, L. (2021). A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome c6/plastocyanin switch in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2017898118.
 - García-Castellanos, R., Marrero, A., Mallorquí-Fernández, G., Potempa, J., Coll, M., y

- Gomis-Rüth, F.X. (2003). Three-dimensional structure of Mecl. Molecular basis for transcriptional regulation of staphylococcal methicillin resistance. *J. Biol. Chem.* *278*, 39897-39905.
- García-Castellanos, R., Mallorquí-Fernández, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M., y Gomis-Rüth, F.X. (2004). On the transcriptional regulation of methicillin resistance: Mecl repressor in complex with its operator. *J. Biol. Chem.* *279*, 17888-17896.
 - García-Domínguez, M., y Florencio, F.J. (1997). Nitrogen availability and electron transport control the expression of glnB gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* *35*, 723-734.
 - García-Domínguez, M., Lopez-Maury, L., Florencio, F.J., y Reyes, J.C. (2000a). A Gene Cluster Involved in Metal Homeostasis in the Cyanobacterium. *J. Bacteriol.* *182*, 1507-1514.
 - García-Domínguez, M., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2000b). NtcA represses transcription of gifA and gifB, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* *35*, 1192-1201.
 - García-Fernández, J.M., de Marsac, N.T., y Diez, J. (2004). Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 630-638.
 - Garst, A.D., Edwards, A.L., y Batey, R.T. (2011). Riboswitches: Structures and mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, 1-13.
 - Ge, H., Fang, L., Huang, X., Wang, J., Chen, W., Zhang, Y., Wang, X., Sui, N., Xu, W., He, Q., et al. (2018). Activation of the Oxidative Pentose Phosphate Pathway is Critical for Photomixotrophic Growth of a hik33-Deletion Mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* *18*, 1-9.
 - Geigenberger, P., Thormählen, I., Daloso, D.M., y Fernie, A.R. (2017). The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. *Trends Plant Sci.* *22*, 249-262.
 - Georg, J., Kostova, G., Vuorijoki, L., Schön, V., Kadowaki, T., Huokko, T., Baumgartner, D., Müller, M., Klähn, S., Allahverdiyeva, Y., et al. (2017). Acclimation of Oxygenic Photosynthesis to Iron Starvation Is Controlled by the sRNA IsaR1. *Curr. Biol.* *27*, 1425-

1436.e7.

- Gerbling, K.P., Steup, M., y Latzko, E. (1985). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Synechococcus leopoliensis* Substrate-dependent dimer-tetramer interconversion. *Eur. J. Biochem.* *147*, 207-215.
- Gerbling, K.P., Steup, M., y Latzko, E. (1986). Fructose 1,6-Bisphosphatase Form B from *Synechococcus leopoliensis* Hydrolyzes both Fructose and Sedoheptulose Bisphosphate. *Plant Physiol.* *80*, 716-720.
- Giner-Lamia, J., Lopez-Maury, L., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2012). The CopRS Two-Component System Is Responsible for Resistance to Copper in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* *159*, 1806-1818.
- Giner-Lamia, J., López-Maury, L., y Florencio, F.J. (2014). Global transcriptional profiles of the copper responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* *9*.
- Giner-Lamia, J., López-Maury, L., y Florencio, F.J. (2015). CopM is a novel copper-binding protein involved in copper resistance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiologyopen* *4*, 167-185.
- Giner-Lamia, J., Pereira, S.B., Bovea-Marco, M., Futschik, M.E., Tamagnini, P., y Oliveira, P. (2016a). Extracellular proteins: Novel key components of metal resistance in cyanobacteria? *Front. Microbiol.* *7*, 1-8.
- Giner-Lamia, J., López-Maury, L., y Florencio, F.J. (2016b). Ni interferes in the Cu-regulated transcriptional switch *petJ/petE* in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* *590*, 3639-3648.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J., y Pace, N.R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* *170*, 3584-3592.
- Glauninger, H., Zhang, Y., Higgins, K.A., Jacobs, A.D., Martin, J.E., Fu, Y., Coyne, H.J., Bruce, K.E., Maroney, M.J., Clemmer, D.E., et al. (2017). Metal-dependent allosteric activation and inhibition on the same molecular scaffold: The copper sensor CopY from: *Streptococcus pneumoniae*. *Chem. Sci.* *9*, 105-118.
- Goldman, S.J., Lammers, P.J., Berman, M.S., y Sanders-Loehr, J. (1983). Siderophore-

- mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp. PCC 6411. *J. Bacteriol.* *156*, 1144-1150.
- Golemi-Kotra, D., Cha, J.Y., Meroueh, S.O., Vakulenko, S.B., y Mobashery, S. (2003). Resistance to β -lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *278*, 18419-18425.
 - Gómez Romero, C. (2015). Caracterización de la regulación de la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante generación de mutantes puntuales. Universidad de Sevilla.
 - Gomori, G. (1943). Calcification and Phosphatase. *Am. J. Pathol.* *19*, 197-209.
 - González-Guerrero, M., Raimunda, D., Cheng, X., y Argüello, J.M. (2010). Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *78*, 1246-1258.
 - González, A., Bes, M.T., Barja, F., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2010). Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 Reveals New Targets for This Regulator Involved in Photosynthesis, Iron Uptake and Cellular Morphology. *Plant Cell Physiol.* *51*, 1900-1914.
 - González, A., Bes, M.T., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2011). Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis. *J. Proteomics* *74*, 660-671.
 - González, A., Bes, M.T., Valladares, A., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2012). FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ. Microbiol.* *14*, 3175-3187.
 - González, A., Angarica, V.E., Sancho, J., y Fillat, M.F. (2014). The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: in silico prediction and experimental validation of novel target genes. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4833-4846.
 - González, A., Bes, M.T., Luisa Peleato, M., y Fillat, M.F. (2016a). Expanding the role of FurA as essential global regulator in cyanobacteria. *PLoS One* *11*, 1-22.
 - González, A., Sevilla, E., Bes, M.T., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2016b). Pivotal Role of Iron in the Regulation of Cyanobacterial Electron Transport. *Adv. Microb. Physiol.* *68*,

169-217.

- Griese, M., Lange, C., y Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**, 124-131.
- Grigorieva, G., y Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 367-370.
- Gründel, M., Scheunemann, R., Lockau, W., y Zilliges, Y. (2012). Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **158**, 3032-3043.
- Guo, J., Nguyen, A.Y., Dai, Z., Su, D., Gaffrey, M.J., Moore, R.J., Jacobs, J.M., Monroe, M.E., Smith, R.D., Koppelaar, D.W., et al. (2014). Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 3270-3285.
- Gutle, D.D., Roret, T., Muller, S.J., Couturier, J., Lemaire, S.D., Hecker, A., Dhalleine, T., Buchanan, B.B., Reski, R., Einsle, O., et al. (2016). Chloroplast FBPase and SBPase are thioredoxin-linked enzymes with similar architecture but different evolutionary histories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6779-6784.
- Hagen, K.D., y Meeks, J.C. (2001). The Unique Cyanobacterial Protein OpcA Is an Allosteric Effector of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *J. Biol. Chem.* **276**, 11477-11486.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.
- Hamilton, T.L. (2019). The trouble with oxygen: The ecophysiology of extant phototrophs and implications for the evolution of oxygenic photosynthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **140**, 233-249.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanique, S., Colombo, M.L., Goormaghtigh, E., Soumillion, P., Frère, J.M., y Joris, B. (2004). Evidence of an Intramolecular Interaction between the Two Domains of the BlaR1 Penicillin Receptor during the Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **279**, 14264-14272.

- He, Z., Zheng, F., Wu, Y., Li, Q., Lv, J., Fu, P., y Mi, H. (2015). NDH-1L interacts with ferredoxin via the subunit NdhS in *Thermosynechococcus elongatus*. *Photosynth. Res.* 126, 341-349.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 341-346.
- Hengge, R. (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 631, 40-53.
- Henry, R., Lo, M., Khoo, C., Zhang, H., Boysen, R.I., Picardeau, M., Murray, G.L., Bulach, D.M., y Adler, B. (2013). Precipitation of iron on the surface of *Leptospira interrogans* is associated with mutation of the stress response metalloprotease HtpX. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4653-4660.
- Hernández, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Neira, J.L., y Peleato, M.L. (2002). Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem. J.* 366, 315-322.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., y Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183, 411-425.
- Hervás, M., Navarro, J.A., y De La Rosa, M.A. (2003). Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Acc. Chem. Res.* 36, 798-805.
- Hirasawa, M., Schürmann, P., Jacquot, J.P., Manieri, W., Jacquot, P., Keryer, E., Hartman, F.C., y Knaff, D.B. (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry* 38, 5200-5205.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3, 239-243.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M.E., Hudemann, C., y Lillig, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375-1377.
- Horecker, B.L., Melloni, E., y Pontremoli, S. (1975). Fructose 1,6-bisphosphatase: properties of the neutral enzyme and its modification by proteolytic enzymes. *Adv.*

- Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 42, 193-226.
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., Wang, Y., y Zuo, J. (2015). Site-Specific Nitrosoproteomic Identification of Endogenously S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 167, 1731-1746.
 - Huber, S.C. (1978). Regulation of chloroplast photosynthetic activity by exogenous magnesium. *Plant Physiol.* 62, 321-325.
 - Ilbert, M., y Bonnefoy, V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 161-175.
 - Imamura, S., y Asayama, M. (2009). Sigma factors for cyanobacterial transcription. *Gene Regul. Syst. Bio.* 3, 65-87.
 - Ishii, A., y Hihara, Y. (2008). An AbrB-like transcriptional regulator, SII0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 148, 660-670.
 - Ito, S., y Osanai, T. (2020). Unconventional biochemical regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp . PCC 6803. *Biochem. J.*
 - Ito, S., Koyama, N., y Osanai, T. (2019). Citrate synthase from *Synechocystis* is a distinct class of bacterial citrate synthase. *Sci. Rep.* 9, 1-9.
 - Ivanov, A.G., Sane, P. V., Simidjiev, I., Park, Y.I., Huner, N.P.A., y Öquist, G. (2012). Restricted capacity for PSI-dependent cyclic electron flow in Δ petE mutant compromises the ability for acclimation to iron stress in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, pp. 1277-1284.
 - Jacquot, J.-P. (2018). Dark deactivation of chloroplast enzymes finally comes to light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 9334 LP - 9335.
 - Jahn, M., Vialas, V., Karlsen, J., Maddalo, G., Edfors, F., Forsström, B., Uhlén, M., Käll, L., y Hudson, E.P. (2018). Growth of Cyanobacteria Is Constrained by the Abundance of Light and Carbon Assimilation Proteins. *Cell Rep.* 25, 478-486.e8.
 - Jeanjean, R., Talla, E., Latifi, A., Havaux, M., Janicki, A., y Zhang, C.-C. (2008). A large gene cluster encoding peptide synthetases and polyketide synthases is involved in production of siderophores and oxidative stress response in the cyanobacterium

- Anabaena* sp. strain PCC 7120. Environ. Microbiol. 10, 2574-2585.
- Jedelská, T., Luhová, L., y Petřivalský, M. (2020). Thioredoxins: Emerging players in the regulation of protein s-nitrosation in plants. Plants 9, 1-16.
 - Jiang, H.-B., Lou, W.-J., Du, H.-Y., Price, N.M., y Qiu, B.-S. (2012a). Sll1263, a unique cation diffusion facilitator protein that promotes iron uptake in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Plant Cell Physiol. 53, 1404-1417.
 - Jiang, H.B., Lou, W.J., Ke, W.T., Song, W.Y., Price, N.M., y Qiu, B.S. (2015). New insights into iron acquisition by cyanobacteria: An essential role for ExbB-ExbD complex in inorganic iron uptake. ISME J. 9, 297-309.
 - Jiang, Y.-H., Wang, D.-Y., y Wen, J.-F. (2012b). The independent prokaryotic origins of eukaryotic fructose-1, 6-bisphosphatase and sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase and the implications of their origins for the evolution of eukaryotic Calvin cycle. BMC Evol. Biol. 12, 208.
 - Johnson, T.R., Haynes, J.I., Wealand, J.L., Yarbrough, L.R., y Hirschberg, R. (1988). Structure and regulation of genes encoding phycocyanin and allophycocyanin from *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J. Bacteriol. 170, 1858-1865.
 - Joshua, S., y Mullineaux, C.W. (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. Plant Physiol. 135, 2112-2119.
 - Kaiser, W.M., y Bassham, J.A. (1979). Light-Dark Regulation of Starch Metabolism in Chloroplasts: II. Effect of Chloroplastic Metabolite Levels on the Formation of ADP-Glucose by Chloroplast Extracts. Plant Physiol. 93, 105-108.
 - Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., et al. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 3, 109-136.
 - Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., et al. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. DNA Res. 8, 205-253.

- Karapetyan, N. V., Holzwarth, A.R., y Rögner, M. (1999). The photosystem I trimer of cyanobacteria: Molecular organization, excitation dynamics and physiological significance. *FEBS Lett.* 460, 395-400.
- Kato, K., Nagao, R., Jiang, T.Y., Ueno, Y., Yokono, M., Chan, S.K., Watanabe, M., Ikeuchi, M., Shen, J.R., Akimoto, S., et al. (2019). Structure of a cyanobacterial photosystem I tetramer revealed by cryo-electron microscopy. *Nat. Commun.* 10, 1-9.
- Kaur, K., Sharma, A., Capalash, N., y Sharma, P. (2019). Multicopper oxidases: Biocatalysts in microbial pathogenesis and stress management. *Microbiol. Res.* 222, 1-13.
- Kaushik, M.S., Srivastava, M., y Mishra, A.K. (2018). Iron homeostasis in cyanobacteria.
- Kay, K.L., Zhou, L., Tenori, L., Bradley, J.M., Singleton, C., Kihlken, M.A., Ciofi-Baffoni, S., y Le Brun, N.E. (2017). Kinetic analysis of copper transfer from a chaperone to its target protein mediated by complex formation. *Chem. Commun. (Camb).* 53, 1397-1400.
- Ke, H.M., Zhang, Y.P., y Lipscomb, W.N. (1990). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5243-5247.
- Ke, H.M., Zhang, Y.P., Liang, J.Y., y Lipscomb, W.N. (1991). Crystal structure of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with the product fructose 6-phosphate at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2989-2993.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- Kelly, G.J., y Latzko, E. (1976). Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. *FEBS Lett.* 68, 55-58.
- Kelly, G.J., Zimmermann, G., y Latzko, E. (1982). Fructose-bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. *Methods Enzymol.* 90, 371-378.
- Keren, N., Aurora, R., y Pakrasi, H.B. (2004). Critical Roles of Bacterioferritins in Iron Storage and Proliferation of Cyanobacteria. *Plant Physiol.* 135, 1666 LP - 1673.
- Kerfeld, C.A., y Melnicki, M.R. (2016). Assembly, function and evolution of

- cyanobacterial carboxysomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 31, 66-75.
- Kerfeld, C.A., Heinhorst, S., y Cannon, G.C. (2010). Bacterial Microcompartments. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 391-408.
 - Khoo, K.K., y Norton, R.S. (2011). Role of Disulfide Bonds in Peptide and Protein Conformation. *Amin. Acids, Pept. Proteins Org. Chem.* 5, 395-417.
 - Kirilovsky, D. (2015). Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: Orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. *Photosynth. Res.* 126, 3-17.
 - Kirilovsky, D., y Kerfeld, C.A. (2013). The Orange Carotenoid Protein: A blue-green light photoactive protein. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 1135-1143.
 - Klauck, E., Lingnau, M., y Hengge-Aronis, R. (2001). Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40, 1381-1390.
 - Kobayashi, D., Tamoi, M., Iwaki, T., Shigeoka, S., y Wadano, A. (2003). Molecular characterization and redox regulation of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 44, 269-276.
 - Kobmann, J., Sonnewald, U., y Willmitzer, L. (1994). Reduction of the chloroplastic fructose-1,6- biphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J.* 6, 637-650.
 - Korn, A. (2010). Respective roles of the ferredoxin:NADP-oxidoreductase isoforms in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Université Paris Sud - Paris XI.
 - Kranzler, C., Lis, H., Finkel, O.M., Schmetterer, G., Shaked, Y., y Keren, N. (2014). Coordinated transporter activity shapes high-affinity iron acquisition in cyanobacteria. *ISME J.* 8, 409-417.
 - Kropat, J., Gallaher, S.D., Urzica, E.I., Nakamoto, S.S., Strenkert, D., Tottey, S., Mason, A.Z., y Merchant, S.S. (2015). Copper economy in *Chlamydomonas*: Prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 2644-2651.
 - Kruger, N.J., y Von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 236-246.

- Krynicka, V., Georg, J., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Hunter, C.N., Futschik, M.E., Hess, W.R., y Komenda, J. (2019). Depletion of the FtsH1/3 proteolytic complex suppresses the nutrient stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Plant Cell* 31, 2912-2928.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Kupriyanova, E. V, Sinetova, M.A., Cho, S.M., Park, Y.-I., Los, D.A., y Pronina, N.A. (2013). CO₂-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin. *Photosynth. Res.* 117, 133-146.
- Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L., y Cramer, W.A. (2003). Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* (80-). 302, 1009-1014.
- Labarre, J., Chauvat, F., y Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449-3457.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambrecht, S.J., Steglich, C., y Hess, W.R. (2020). A minimum set of regulators to thrive in the ocean. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T., y Ben-Tal, N. (2005). ConSurf 2005: The projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res.* 33, 299-302.
- Lange, R., y Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription , translation , and protein stability. *Genes Dev.* 8, 1600-1612.
- Latunde-Dada, Y. (2017). Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861.
- Laughlin, T.G., Bayne, A.N., Trempe, J.F., Savage, D.F., y Davies, K.M. (2019). Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis. *Nature* 566, 411-414.

- Lawson, T., Bryant, B., Lefebvre, S., Lloyd, J.C., y Raines, C.A. (2006). Decreased SBPase activity alters growth and development in transgenic tobacco plants. *Plant, Cell Environ.* 29, 48-58.
- Lee, S.-W., y Hahn, T.-R. (2003). Light-regulated differential expression of pea chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatases. *Plant Cell Rep.* 21, 611-618.
- Lefebvre, S., Lawson, T., Fryer, M., Zakhleniuk, O. V, Lloyd, J.C., y Raines, C.A. (2005). Increased Sedoheptulose-1, 7-Bisphosphatase Activity in Transgenic Tobacco Plants Stimulates Photosynthesis and Growth from an Early Stage in Development 1. *Plant Physiol.* 138, 451-460.
- Leonhardt, K., y Straus, N.A. (1994). Photosystem II genes *isiA*, *psbDI* and *psbC* in *Anabaena* sp. PCC 7120: cloning, sequencing and the transcriptional regulation in iron-stressed and iron-repleted cells. *Plant Mol. Biol.* 24, 63-73.
- Lewis, R.A., y Dyke, K.G.H. (2000). Mecl represses synthesis from the β -lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 139-144.
- Li, W.K.W. (1994). Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: Measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.* 39, 169-175.
- Li, M., Yang, Q., Zhang, L., Li, H., Cui, Y., y Wu, Q. (2007). Identification of novel targets of cyanobacterial glutaredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 458, 220-228.
- Li, W., Su, H.N., Pu, Y., Chen, J., Liu, L.N., Liu, Q., y Qin, S. (2019). Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnol. Adv.* 37, 340-353.
- Liang, F., y Lindblad, P. (2016). Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Metab. Eng.* 38, 56-64.
- Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., y Pakrasi, H.B. (2006). Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* 227, 129-138.
- Lin, C.-T., Wu, C.-C., Chen, Y.-S., Lai, Y.-C., Chi, C., Lin, J.-C., Chen, Y., y Peng, H.-L. (2011). Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition

- systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology* 157, 419-429.
- Lindahl, M., y Florencio, F.J. (2003). Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 16107 LP - 16112.
 - Lindberg, P., Park, S., y Melis, A. (2010). Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab. Eng.* 12, 70-79.
 - Liu, L.-N. (2016). Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 256-265.
 - Liu, L.N., Bryan, S.J., Huang, F., Yu, J., Nixon, P.J., Rich, P.R., y Mullineaux, C.W. (2012). Control of electron transport routes through redox-regulated redistribution of respiratory complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11431-11436.
 - Liu, T., Chen, X., Ma, Z., Shokes, J., Hemmingsen, L., Scott, R.A., y Giedroc, D.P. (2008). A Cu(I)-sensing ArsR family metal sensor protein with a relaxed metal selectivity profile. *Biochemistry* 47, 10564-10575.
 - Llarrull, L.I., y Mobashery, S. (2012). Dissection of Events in the Resistance to β -Lactam Antibiotics Mediated by the Protein BlaR1 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 51, 4642-4649.
 - Llarrull, L.I., Toth, M., Champion, M.M., y Mobashery, S. (2011). Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 38148-38158.
 - Lloyd, D.R., y Phillips, D.H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 23-36.
 - Lockau, W. (1981). Evidence for a dual role of cytochrome c-553 and plastocyanin in photosynthesis and respiration of the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* 128, 336-340.
 - Long, B.M., Rae, B.D., Rolland, V., Förster, B., y Price, G.D. (2016). Cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism components: Function and prospects for plant metabolic

- engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* *31*, 1-8.
- López-Calcano, P.E., Howard, T.P., y Raines, C.A. (2014). The CP12 protein family: A thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front. Plant Sci.* *5*, 1-9.
 - López-García, P., Moreira, D., Douzery, E., Forterre, P., Zuilen, M., Claeys, P., y Prieur, D. (2006). Ancient fossil record and early evolution (ca. 3.8 to 0.5 Ga). *Earth, Moon Planets* *98*, 247-290.
 - López-Gomollón, S., Hernández, J.A., Pellicer, S., Angarica, V.E., Peleato, M.L., y Fillat, M.F. (2007). Cross-talk Between Iron and Nitrogen Regulatory Networks in *Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120*: Identification of Overlapping Genes in FurA and NtcA Regulons. *J. Mol. Biol.* *374*, 267-281.
 - López-Maury, L., García-Domínguez, M., Florencio, F.J., y Reyes, J.C. (2002). A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Mol. Microbiol.* *43*, 247-256.
 - López-Maury, L., Florencio, F.J., y Reyes, J.C. (2003). Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis sp. Strain PCC 6803*. *J. Bacteriol.*
 - López-Maury, L., Heredia-Martínez, L.G., y Florencio, F.J. (2018). Characterization of TrxC, an Atypical Thioredoxin Exclusively Present in Cyanobacteria. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* *7*, 164.
 - Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265-275.
 - Lu, Y. (2003). 8.4 - Electron Transfer: Cupredoxins. In *Comprehensive Coordination Chemistry II*, J.A. McCleverty, y T.J.B.T.-C.C.C.I.I. Meyer, eds. (Oxford: Pergamon), pp. 91-122.
 - Lyons, J.A., Aragão, D., Slattery, O., Pislakov, A. V, Soulimane, T., y Caffrey, M. (2012). Structural insights into electron transfer in *caa3*-type cytochrome oxidase. *Nature* *487*, 514-518.
 - Mackinney, R. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* *140*, 315-322.
 - Maeda, S., Badger, M.R., y Price, G.D. (2002). Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration

- in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol. Microbiol.* **43**, 425-435.
- Makowka, A., Nichelmann, L., Schulze, D., Spengler, K., Wittmann, C., Forchhammer, K., y Gutekunst, K. (2020). Glycolytic shunts replenish the Calvin-Benson-Bassham cycle as anaplerotic reactions in Cyanobacteria. *Mol. Plant* **13**, 471-482.
 - Malavath, T., Caspy, I., Netzer-El, S.Y., Klaiman, D., y Nelson, N. (2018). Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1859**, 645-654.
 - Mallen-Ponce, M.J. (2020). Esencialidad de la tiorredoxina TrxA en cianobacterias. Estudio de un mutante condicional en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Universidad de Sevilla.
 - Marcus, F., Edelstein, I., Reardon, I., y Heinrikson, R.L. (1982). Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7161-7165.
 - Mareš, J., Strunecký, O., Bučinská, L., y Wiedermannová, J. (2019). Evolutionary patterns of thylakoid architecture in Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **10**, 1-22.
 - Marin, K., Kanesaki, Y., Los, D.A., Murata, N., Suzuki, I., y Hagemann, M. (2004). Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **136**, 3290-3300.
 - Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.
 - Marrero, A., Mallorquí-Fernández, G., Guevara, T., García-Castellanos, R., y Gomis-Rüth, F.X. (2006). Unbound and acylated structures of the MecR1 extracellular antibiotic-sensor domain provide insights into the signal-transduction system that triggers methicillin resistance. *J. Mol. Biol.* **361**, 506-521.
 - Marri, L., Zaffagnini, M., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Lemaire, S.D., Pupillo, P., Sparla, F., Miginiac-Maslow, M., y Trost, P. (2009). Prompt and easy activation by specific thioredoxins of calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Mol. Plant* **2**, 259-269.
 - Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., y Cassier-Chauvat, C. (2009). The

thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **71**, 520-532.

- Maruyama, M., Nishiguchi, H., Toyoshima, M., Okahashi, N., Matsuda, F., y Shimizu, H. (2019). Time-resolved analysis of short term metabolic adaptation at dark transition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biosci. Bioeng.* xxx.
- Mata-Cabana, A., Florencio, F.J., y Lindahl, M. (2007). Membrane proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 interacting with thioredoxin. *Proteomics* **7**, 3953-3963.
- Van de Meene, A.M.L., Hohmann-Marriott, M.F., Vermaas, W.F.J., y Roberson, R.W. (2006). The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **184**, 259-270.
- Merino-Puerto, V., Mariscal, V., Mullineaux, C.W., Herrero, A., y Flores, E. (2010). Fra proteins influencing filament integrity, diazotrophy and localization of septal protein SepJ in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *Mol. Microbiol.* **75**, 1159-1170.
- Merrick, M.J. (1993). In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor σ_{54} (σ_N). *Mol. Microbiol.* **10**, 903-909.
- Mescola, A., Dauvin, M., Amoroso, A., Duwez, A.S., y Joris, B. (2019). Single-molecule force spectroscopy to decipher the early signalling step in membrane-bound penicillin receptors embedded into a lipid bilayer. *Nanoscale* **11**, 12275-12284.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., y Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 335-367.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., y Kannt, A. (1998). Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M.E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C.H., Fermani, S., Trost, P., et al. (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Front. Mol. Biosci.* **4**, 1-21.
- Mihara, S., Wakao, H., Yoshida, K., Higo, A., Sugiura, K., Tsuchiya, A., Nomata, J., Wakabayashi, K., y Hisabori, T. (2018). Thioredoxin regulates G6PDH activity by changing redox states of OpcA in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp.

- PCC 7120. *Biochem. J.* **475**, 1091-1105.
- Mihara, S., Sugiura, K., Yoshida, K., y Hisabori, T. (2020). Thioredoxin targets are regulated in heterocysts of cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 in a light-independent manner. *J. Exp. Bot.* **71**, 2018-2027.
 - Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E.A., Darst, S.A., Ebright, R.H., y Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit ω and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 892-897.
 - Mirus, O., Strauss, S., Nicolaisen, K., von Haeseler, A., y Schleiff, E. (2009). TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biol.* **7**, 68.
 - Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C.M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voß, B., Steglich, C., Wilde, A., Vogel, J., et al. (2011). An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2124-2129.
 - Miyagawa, Y., Tamoi, M., y Shigeoka, S. (2001). Overexpression of a cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth. *Nat. Biotechnol.* **19**, 965-969.
 - Mohamed, A., y Jansson, C. (1989). Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**, 693-700.
 - Montoya, J.P., Holl, C.M., Zehr, J.P., Hansen, A., Villareal, T.A., y Capone, D.G. (2004). High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* **430**, 1027-1031.
 - Montrichard, F., Alkhalifioui, F., Yano, H., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., y Buchanan, B.B. (2009). Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. *J. Proteomics* **72**, 452-474.
 - Morel, F.M.M., Rueter, J.G., y Price, N.M. (1991). Iron Nutrition of Phytoplankton and its Possible Importance in the Ecology of Ocean Regions with High Nutrient and Low Biomass. *Oceanography* **4**, 56-61.
 - Moreno-Cabezuelo, J.Á., López-Lozano, A., Díez, J., y García-Fernández, J.M. (2019).

Differential expression of the glucose transporter gene *glcH* in response to glucose and light in marine picocyanobacteria. *PeerJ* 2019.

- Morisse, S., Michelet, L., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Calvaresi, M., Trost, P., Fermani, S., Zaffagnini, M., y Lemaire, S.D. (2014). Thioredoxin-dependent redox regulation of chloroplastic phosphoglycerate kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 289, 30012-30024.
- Morrissey, J., y Bowler, C. (2012). Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae. *Front. Microbiol.* 3, 43.
- Muñoz-Marín, M. del C., Gómez-Baena, G., Díez, J., Beynon, R.J., González-Ballester, D., Zubkov, M. V., y García-Fernández, J.M. (2017). Glucose uptake in *Prochlorococcus*: Diversity of kinetics and effects on the metabolism. *Front. Microbiol.* 8, 1-17.
- Muro-Pastor, A.M., y Hess, W.R. (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol.* 20, 548-557.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., y Florencio, F.J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83, 135-150.
- Musser, S.M., Stowell, M.H.B., y Chan, S.I. (1993). Comparison of ubiquinol and cytochrome c terminal oxidases. *FEBS Lett.* 327, 131-136.
- Nakajima, T., Kajihata, S., Yoshikawa, K., Matsuda, F., Furusawa, C., Hirasawa, T., y Shimizu, H. (2014). Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions. *Plant Cell Physiol.* 55, 1606-1612.
- Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., y Shimizu, H. (2017). Metabolic Flux Analysis of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ nrtABCD Mutant Reveals a Mechanism for Metabolic Adaptation to Nitrogen-Limited Conditions. *Plant Cell Physiol.* 58, 537-545.
- Naranjo, B., Diaz-Espejo, A., Lindahl, M., y Cejudo, F.J. (2016). Type-f thioredoxins have a role in the short-term activation of carbon metabolism and their loss affects growth under short-day conditions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 67, 1951-1964.
- Nawrocki, W.J., Bailleul, B., Picot, D., Cardol, P., Rappaport, F., Wollman, F.A., y Joliot,

- P. (2019). The mechanism of cyclic electron flow. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1860, 433-438.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., y Smith, D.F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* 119, 736-747.
 - Neidhardt, F.C.N., Ingraham, J.L., y Schaechter, M. (1990). *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach* (Sinauer Associates).
 - Nelson, S.W., Kurbanov, F.T., Honzatko, R.B., y Fromm, H.J. (2001). The N-terminal segment of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase participates in the allosteric regulation of catalysis. *J. Biol. Chem.* 276, 6119-6124.
 - Nicolaisen, K., Moslavac, S., Samborski, A., Valdebenito, M., Hantke, K., Maldener, I., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., y Schleiff, E. (2008). Alr0397 Is an Outer Membrane Transporter for the Siderophore Schizokinen in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 190, 7500 LP - 7507.
 - Nishiguchi, H., Liao, J., Shimizu, H., y Matsuda, F. (2020). Novel allosteric inhibition of phosphoribulokinase identified by ensemble kinetic modeling of *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. *Metab. Eng. Commun.* 11, e00153.
 - Nishimura, T., Takahashi, Y., Yamaguchi, O., Suzuki, H., Maeda, S.I., y Omata, T. (2008). Mechanism of low CO₂-induced activation of the *cmp* bicarbonate transporter operon by a LysR family protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 68, 98-109.
 - Nordal, a, Benson, a a, y Calvin, M. (1956). Phytosynthesis of sedoheptulose-C14. *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 435-445.
 - Obando, T.A.S., Babykin, M.M., y Zinchenko, V. V. (2018). A Cluster of Five Genes Essential for the Utilization of Dihydroxamate Xenosiderophores in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* 75, 1165-1173.
 - Ochiai, E. (1983). Copper and the biological evolution. *BioSystems* 16, 81-86.
 - Odermatt, A., y Solioz, M. (1995). Two trans-acting metalloregulatory proteins controlling expression of the copper-ATPases of *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 270, 4349-4354.
 - Ogawa, T., Tamoi, M., Kimura, A., Mine, A., Sakuyama, H., Yoshida, E., Maruta, T.,

- Suzuki, K., Ishikawa, T., y Shigeoka, S. (2015). Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production. *Biotechnol. Biofuels* 8, 80.
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J.M., y Cejudo, F.J. (2018a). The NADPH-Dependent thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin redox system modulates the activity of thioredoxin x in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 59, 2155-2164.
 - Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J.M., y Cejudo, F.J. (2018b). 2-Cys Peroxiredoxins Participate in the Oxidation of Chloroplast Enzymes in the Dark. *Mol. Plant* 11, 1377-1388.
 - Omata, T., Price, G.D., Badger, M.R., Okamura, M., Gohta, S., y Ogawa, T. (1999). Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13571-13576.
 - Omata, T., Gohta, S., Takahashi, Y., Harano, Y., y Maeda, S.I. (2001). Involvement of a CbbR homolog in low CO₂-induced activation of the bicarbonate transporter operon in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183, 1891-1898.
 - Peacock, S.J., y Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577-601.
 - Peltier, G., Aro, E.-M., y Shikanai, T. (2016). NDH-1 and NDH-2 Plastoquinone Reductases in Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 55-80.
 - Pence, M.A., Haste, N.M., Meharena, H.S., Olson, J., Gallo, R.L., Nizet, V., y Kristian, S.A. (2015). Beta-lactamase repressor blai modulates *Staphylococcus aureus* cathelicidin antimicrobial peptide resistance and virulence. *PLoS One* 10, 1-15.
 - Pérez-Pérez, M.E., Martín-Figueroa, E., y Florencio, F.J. (2009a). Photosynthetic regulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 thioredoxin system and functional analysis of TrxB (Trx x) and TrxQ (Trx y) thioredoxins. *Mol. Plant* 2, 270-283.
 - Pérez-Pérez, M.E., Mata-Cabana, A., Sánchez-Riego, A.M., Lindahl, M., y Florencio, F.J. (2009b). A comprehensive analysis of the peroxiredoxin reduction system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 reveals that all five peroxiredoxins are thioredoxin dependent. *J. Bacteriol.* 191, 7477-7489.

- Persuh, M., Turgay, K., Mandic-Mulec, I., y Dubnau, D. (1999). The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol. Microbiol.* 33, 886-894.
- Peschek, G.A., Obinger, C., y Paumann, M. (2004). The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria). *Physiol. Plant.* 120, 358-369.
- Pessaraki, M. (2018). *Handbook of Photosynthesis* (CRC Press).
- Pfanschmidt, T., y Yang, C. (2012). The hidden function of photosynthesis: A sensing system for environmental conditions that regulates plant acclimation responses. *Protoplasma* 249, 125-136.
- Pils, D., y Schmetterer, G. (2006). Characterization of three bioenergetically active respiratory terminal oxidases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 217-222.
- Pinochet-Barros, A., y Helmann, J.D. (2020). *Bacillus subtilis* Fur is a transcriptional activator for the PerR-repressed *pfeT* gene encoding an iron efflux pump. *J. Bacteriol.*
- Poole, L.B., Karplus, P.A., y Claiborne, A. (2004). Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 325-347.
- Porcellinis, A.J. De, Nørgaard, H., Brey, M.F., Erstad, S.M., Jones, R., Heazlewood, J.L., y Sakuragi, Y. (2018). Overexpression of bifunctional fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to enhanced photosynthesis and global reprogramming of carbon metabolism in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Metab. Eng.* 47, 170-183.
- Porter, R.D. (1986). Transformation in Cyanobacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 111-132.
- Portmann, R., Poulsen, K.R., Wimmer, R., y Solioz, M. (2006). CopY-like copper inducible repressors are putative «winged helix» proteins. *Biometals an Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 19, 61-70.
- Pradel, J., Soulié, J.M., Buc, J., Meunier, J.C., y Ricard, J. (1981). On the activation of fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts and the regulation of the Calvin cycle. *Eur. J. Biochem.* 113, 507-511.
- Price, G.D., Woodger, F.J., Badger, M.R., Howitt, S.M., y Tucker, L. (2004).

- Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 18228-18233.
- Prommeenate, P., Lennon, A.M., Markert, C., Hippler, M., y Nixon, P.J. (2004). Subunit composition of NDH-1 complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of two new ndh gene products with nuclear-encoded homologues in the chloroplast Ndh complex. *J. Biol. Chem.* *279*, 28165-28173.
 - Qiu, G.-W., Lou, W.-J., Sun, C.-Y., Yang, N., Li, Z.-K., Li, D.-L., Zang, S.-S., Fu, F.-X., Hutchins, D.A., Jiang, H.-B., et al. (2018). Outer Membrane Iron Uptake Pathways in the Model Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* *84*.
 - Qiu, G.-W., Jiang, H.-B., Lis, H., Li, Z.-K., Deng, B., Shang, J.-L., Sun, C.-Y., Keren, N., y Qiu, B.-S. (2021). A unique porin mediates iron-selective transport through cyanobacterial outer membranes. *Environ. Microbiol.* *23*, 376-390.
 - Rademacher, C., y Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology* *158*, 2451-2464.
 - Raines, C.A. (2003). The Calvin cycle revisited. *Photosynth. Res.* *75*, 1-10.
 - Rashid, N., Imanaka, H., Kanai, T., Fukui, T., Atomi, H., y Imanaka, T. (2002). A novel candidate for the true fructose-1,6-bisphosphatase in Archaea. *J. Biol. Chem.* *277*, 30649-30655.
 - Rawlings, N.D., y Barrett, A.J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* *248*, 183-228.
 - Reichmann, D., y Jakob, U. (2012). The roles of conditional disorder in redox proteins. *Dana. Curr. Opin. Struct. Biol.* *23*, 436-442.
 - Reisser, W. (1984). Endosymbiotic Cyanobacteria and Cyanellae.
 - Reyes-Prieto, A., y Bhattacharya, D. (2007). Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol. Biol. Evol.* *24*, 2358-2361.
 - Reyes-Sosa, F.M., Gil-Martínez, J., y Molina-Heredia, F.P. (2011). Cytochrome c 6-like protein as a putative donor of electrons to photosystem I in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7119. *Photosynth. Res.* *110*, 61-72.

- Rippka, R. (1972). Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* *87*, 93-98.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., y Stanier, R.Y. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* *111*, 1-61.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., y Lang, B.F. (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.* *15*, 1325-1330.
- Rögner, M., Mühlenhoff, U., Boekema, E.J., y Witt, H.T. (1990). Mono-, di- and trimeric PS I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp.: Size, shape and activity. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* *1015*, 415-424.
- Romano, A.H., y Conway, T. (1996). Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res. Microbiol.* *147*, 448-455.
- Rutherford, J.C., Cavet, J.S., y Robinson, N.J. (1999). Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J. Biol. Chem.* *274*, 25827-25832.
- Safo, M.K., Robinson, H., Scarsdale, N., y Archer, G.L. (2005). Crystal Structures of the Blal Repressor from *Staphylococcus aureus* and Its Complex with DNA: Insights into Transcriptional Regulation of the bla and mec Operons. *J. Bacteriol.* *187*, 1833-1844.
- Safo, M.K., Ko, T.P., Musayev, F.N., Zhao, Q., Wang, A.H.J., y Archer, G.L. (2006). Structure of the MecI repressor from *Staphylococcus aureus* in complex with the cognate DNA operator of mec. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *62*, 320-324.
- Saha, R., Liu, D., Hoynes-O'Connor, A., Liberton, M., Yu, J., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Balassy, A., Zhang, F., Moon, T.S., Maranas, C.D., et al. (2016). Diurnal regulation of cellular processes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Insights from transcriptomic, fluxomic, and physiological analyses. *MBio* *7*.
- Sakoh, M., Ito, K., y Akiyama, Y. (2005). Proteolytic activity of HtpX, a membrane-

- bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *280*, 33305-33310.
- Sala, C., Haouz, A., Saul, F.A., Miras, I., Rosenkrands, I., Alzari, P.M., y Cole, S.T. (2009). Genome-wide regulon and crystal structure of Blal (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* *71*, 1102-1116.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
 - Sánchez-Baracaldo, P., y Cardona, T. (2020). On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytol.* *225*, 1440-1446.
 - Sánchez-Baracaldo, P., Hayes, P.K., y Blank, C.E. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* *3*, 145-165.
 - Sandmann, G. (1986). Formation of plastocyanin and cytochrome c-553 in different species of blue-green algae. *Arch. Microbiol.* *145*, 76-79.
 - Sandmann, G., y Böger, P. (1980). Copper-induced exchange of plastocyanin and cytochrome c-533 in cultures of *Anabaena variabilis* and *Plectonema boryanum*. *Plant Sci. Lett.* *17*, 417-424.
 - Sandström, S., Park, Y.I., Oquist, G., y Gustafsson, P. (2001). CP43', the *isiA* gene product, functions as an excitation energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photochem. Photobiol.* *74*, 431-437.
 - Sanz-Barrio, R., Fernández-San Millán, A., Carballeda, J., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J.M., y Farran, I. (2012). Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *J. Exp. Bot.* *63*, 365-379.
 - Sarkar, D., Mueller, T.J., Liu, D., Pakrasi, H.B., y Maranas, C.D. (2019). A diurnal flux balance model of *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. *PLoS Comput. Biol.* *15*, 1-29.
 - Sastry, A. V., Gao, Y., Szubin, R., Hefner, Y., Xu, S., Kim, D., Choudhary, K.S., Yang, L., King, Z.A., y Palsson, B.O. (2019). The *Escherichia coli* transcriptome mostly consists of independently regulated modules. *Nat. Commun.* *10*, 5536.
 - Van Schaftingen, E., y Hers, H.G. (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by

- fructose 2,6-bisphosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 2861-2863.
- Scheffler, J.E., y Fromm, H.J. (1986). Regulation of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase by metals, nucleotides, and fructose 2,6-bisphosphate as determined from fluorescence studies. Biochemistry 25, 6659-6665.
 - Scherer, S. (1990). Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? Trends Biochem. Sci. 15, 458-462.
 - Schirromeister, B.E., de Vos, J.M., Antonelli, A., y Bagheri, H.C. (2013). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 1791 LP - 1796.
 - Schmetterer, G.R. (1990). Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters. Plant Mol. Biol. 14, 697-706.
 - Schmidt, A. (1981). A thioredoxin-activated fructose-1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. Planta.
 - Schopf, J.W. (1993). Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. Science (80-.). 260, 640-646.
 - Schopf, J.W. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. Photosynth. Res. 107, 87-101.
 - Schorsch, M., Kramer, M., Goss, T., Eisenhut, M., Robinson, N., Osman, D., Wilde, A., Sadaf, S., Brückler, H., Walder, L., et al. (2018). A unique ferredoxin acts as a player in the low-iron response of photosynthetic organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, E12111-E12120.
 - Schweder, T., Lee, K.H., Lomovskaya, O., y Martin, A. (1996). Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. J. Bacteriol. 178, 470-476.
 - Seo, S.W., Kim, D., Latif, H., O'Brien, E.J., Szubin, R., y Palsson, B.O. (2014). Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. Nat. Commun. 5, 4910.
 - Serrato, A.J., Yubero-Serrano, E.M., Sandalio, L.M., Muñoz-Blanco, J., Chueca, A., Caballero, J.L., y Sahrawy, M. (2009). CpFBPaseII, a novel redox-independent chloroplastic isoform of fructose-1,6-bisphosphatase. Plant, Cell Environ. 32, 811-827.

- Serrato, A.J., Fernández-Trijueque, J., Barajas-López, J.-D.-D., Chueca, A., Sahrawy, M., y Reichheld, J.-P. (2013). Plastid thioredoxins: a " one-for-all " redox-signaling system in plants. *Front. Plant Sci.* 1120, 28-1.
- Serrato, A.J., Romero-Puertas, M.C., Lázaro-Payo, A., y Sahrawy, M. (2018). Regulation by S-nitrosylation of the Calvin-Benson cycle fructose-1,6-bisphosphatase in *Pisum sativum*. *Redox Biol.* 14, 409-416.
- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J.J., y Jiménez, A. (2015). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *J. Exp. Bot.* 66, 2945-2955.
- Shafeeq, S., Yesilkaya, H., Kloosterman, T.G., Narayanan, G., Wandel, M., Andrew, P.W., Kuipers, O.P., y Morrissey, J.A. (2011). The cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 81, 1255-1270.
- Shcolnick, S., y Keren, N. (2006). Metal Homeostasis in Cyanobacteria and Chloroplasts. Balancing Benefits and Risks to the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiol.* 141, 805 LP - 810.
- Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A., y Ogawa, T. (2002). Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* 277, 18658-18664.
- Shieh, H.L., y Chiang, H.L. (1998). In vitro reconstitution of glucose-induced targeting of fructose-1, 6-bisphosphatase into the vacuole in semi-intact yeast cells. *J. Biol. Chem.* 273, 3381-3387.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau De Marsac, N., Rippka, R., et al. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1053-1058.
- Shimakawa, G., y Miyake, C. (2018). Respiratory terminal oxidases alleviate photo-oxidative damage in photosystem I during repetitive short-pulse illumination in

- Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 137, 241-250.
- Shimakawa, G., Hasunuma, T., Kondo, A., Matsuda, M., Makino, A., y Miyake, C. (2014). Respiration accumulates Calvin cycle intermediates for the rapid start of photosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1997-2007.
 - Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K., y Akiyama, Y. (2002). The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. *Genes Cells* 7, 653-662.
 - Shinde, S., Zhang, X., Singapuri, S.P., Kalra, I., Liu, X., Morgan-Kiss, R.M., y Wang, X. (2020). Glycogen metabolism supports photosynthesis start through the oxidative pentose phosphate pathway in cyanobacteria. *Plant Physiol.* 182, 507-517.
 - Skalecki, K., Rakus, D., Wiśniewski, J.R., Kolodziej, J., y Dzugaj, A. (1999). cDNA sequence and kinetic properties of human lung fructose(1, 6)bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 1-9.
 - Solioz, M., y Stoyanov, J. V (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 183-195.
 - Solioz, M., Abicht, H.K., Mermod, M., y Mancini, S. (2010). Response of gram-positive bacteria to copper stress. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC a Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 15, 3-14.
 - Stanier, R.Y., y Cohen-Bazire, G. (1977). Phototrophic prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annu. Revi. Microbiol.* 31, 225-274.
 - Stevanovic, M., Lehmann, C., y Schleiff, E. (2013). The response of the TonB-dependent transport network in *Anabaena* sp . PCC 7120 to cell density and metal availability. *BioMetals* 26, 549-560.
 - Strand, Ê., Zrenner, R., Trevanion, S., Stitt, M., Gustafsson, P., y Gardestro, P. (2000). Decreased expression of two key enzymes in the sucrose bisphosphatase and sucrose phosphate synthase , has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 756-770.
 - Straude, M.W., Frederik, T.E., Natarajan, S. V., Wilson, B.D., Tanner, C.E., Ruggiero, S.T., Mobashery, S., y Peng, J.W. (2015). Investigation of Signal Transduction Routes

- within the Sensor/ Transducer Protein BlaR1 of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 54, 1600-1610.
- Ströher, E., y Millar, A.H. (2012). The biological roles of glutaredoxins. *Biochem. J.* 446, 333-348.
 - Studier, F.W., y Moffatt, B.A. (1986). Use of *bacteriophage T7* RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*1. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
 - Le Sueur, A.L., Schaugaard, R.N., Baik, M.H., y Thielges, M.C. (2016). Methionine Ligand Interaction in a Blue Copper Protein Characterized by Site-Selective Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 7187-7193.
 - Sun, Y., Liao, X., Li, D., Feng, L., Li, J., Wang, X., Jin, J., Yi, F., Zhou, L., y Wan, J. (2012). Study on the interaction between cyanobacteria FBP/SBPase and metal ions. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 89, 337-344.
 - Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., et al. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47, D607-D613.
 - Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E., y Ros, J. (2003). Biochemical Characterization of Yeast Mitochondrial Grx5 Monothiol Glutaredoxin *. *J. Biol. Chem.* 278, 25745-25751.
 - Tamoi, M., Ishikawa, T., Takeda, T., y Shigeoka, S. (1996). Molecular characterization and resistance to hydrogen peroxide of two fructose-1,6-bisphosphatases from *Synechococcus* PCC 7942. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 27-36.
 - Tamoi, M., Murakami, A., Takeda, T., y Shigeoka, S. (1998). Acquisition of a new type of fructose-1,6-bisphosphatase with resistance to hydrogen peroxide in cyanobacteria: Molecular characterization of the enzyme from *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1383, 232-244.
 - Tamoi, M., Nagaoka, M., Miyagawa, Y., y Shigeoka, S. (2006). Contribution of Fructose-1,6-bisphosphatase and Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the Photosynthetic Rate and Carbon Flow in the Calvin Cycle in Transgenic Plants. *Plant Cell Physiol.* 47, 380-390.

- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbé, J., y Campoy, S. (2011). Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the hIld Operator In Vivo and In Vitro. PLoS One 6, e19711.
- Tejada Gómez, I. (2018). Nuevas herramientas genéticas en *Synechocystis* sp . PCC 6803 basadas en el sistema de resistencia a arsénico.
- Tejwani, G.A. (1983). Regulation of fructose-bisphosphatase activity. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 54, 121-194.
- Thiel, T., y Poo, H. (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. J. Bacteriol. 171, 5743-5746.
- Thomas, J.C., Ughy, B., Lagoutte, B., y Ajlani, G. (2006). A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., y Ohno, T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 5442-5447.
- Torrado, A. (2017). Estudio funcional y estructural de las isoformas del citocromo c 6.
- Torrado, A., Valladares, A., Puerto-Galán, L., Hervás, M., Navarro, J.A., y Molina-Heredia, F.P. (2017). Cyt c6-3: A new isoform of photosynthetic Cyt c6 exclusive to heterocyst-forming cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 58, 256-265.
- Tottey, S., Harvie, D.R., y Robinson, N.J. (2005). Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. Acc. Chem. Res. 38, 775-783.
- Tottey, S., Waldron, K.J., Firbank, S.J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T.R., Gray, J., Banfield, M.J., Dennison, C., et al. (2008). Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. Nature 455, 1138-1142.
- Tottey, S., Patterson, C.J., Banci, L., Bertini, I., Felli, I.C., Pavelkova, A., y Dainty, S.J. (2012). Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 95-100.
- Tripp, H.J., Bench, S.R., Turk, K.A., Foster, R.A., Desany, B.A., Niazi, F., Affourtit, J.P., y Zehr, J.P. (2010). Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. Nature 464, 90-94.
- Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G., y Dubnau, D. (1997). Biochemical

- characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 11, 119-128.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., y Dubnau, D. (1998). Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* 17, 6730-6738.
 - Udvardy, J., Godeh, M.M., y Farkas, G.L. (1982). Regulatory properties of a fructose 1,6-biphosphatase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 151, 203-208.
 - Ueda, K., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., y Shimizu, H. (2018). Metabolic flux of the oxidative pentose phosphate pathway under low light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 38-43.
 - Vavilin, D. V, y Vermaas, W.F.J. (2002). Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol. Plant.* 115, 9-24.
 - Vega-Palas, M.A., Flores, E., y Herrero, A. (1992). NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* 6, 1853-1859.
 - Vermaas, W.F. (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. *Encycl. Life Sci.* 245-251.
 - Vijayan, V., Jain, I.H., y O'Shea, E.K. (2011). A high resolution map of a cyanobacterial transcriptome. *Genome Biol.* 12, R47.
 - Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y., y Lipscomb, W.N. (1995). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8 Å resolution. *Biochemistry* 34, 4299-4306.
 - Vinyard, D.J., Ananyev, G.M., y Dismukes, G.C. (2013). Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 577-606.
 - Vioque, A. (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 20, 6331-6337.
 - Vlamis-Gardikas, A., y Holmgren, A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms.

Methods Enzymol. 347, 286-296.

- Vogel, J., Axmann, I.M., Herzel, H., y Hess, W.R. (2003). Experimental and computational analysis of transcriptional start sites in the cyanobacterium *Prochlorococcus* MED4. *Nucleic Acids Res.* 31, 2890-2899.
- Wagner, W., y Follmann, H. (1978). Multiple Functions of Thioredoxins. *Z. naturforsch* 33, 517-520.
- Waldron, K.J., y Robinson, N.J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 25-35.
- Waldron, K.J., Tottey, S., Yanagisawa, S., Dennison, C., y Robinson, N.J. (2007). A Periplasmic Iron-binding Protein Contributes toward Inward Copper Supply. *J. Biol. Chem.* 282, 3837-3846.
- Waldron, K.J., Firbank, S.J., Dainty, S.J., Tottey, S., y Robinson, N.J. (2010). Structure and Metal Loading of a Soluble Periplasm. *J. Biol. Chem.* 285, 32504-32511.
- Van Walraven, H.S., Strotmann, H., Schwarz, O., y Rumberg, B. (1996). The H⁺/ATP coupling ratio of the ATP synthase from thiol-modulated chloroplasts and two cyanobacterial strains is four. *FEBS Lett.* 379, 309-313.
- Wan, N., DeLorenzo, D.M., He, L., You, L., Immethun, C.M., Wang, G., Baidoo, E.E.K., Hollinshead, W., Keasling, J.D., Moon, T.S., et al. (2017). Cyanobacterial carbon metabolism: Fluxome plasticity and oxygen dependence. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1593-1602.
- Wang, M., Bi, H., Liu, P., y Ai, X. (2011). Molecular cloning and expression analysis of the gene encoding sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase from *Cucumis sativus*. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 129, 414-420.
- Wang, T., Shen, G., Balasubramanian, R., Mcintosh, L., Bryant, D.A., y Golbeck, J.H. (2004). The *sufR* Gene (*sll0088* in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803) Functions as a Repressor of the *sufBCDS* Operon in Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 186, 1-12.
- Wang, X.-Q., Jiang, H.-B., Zhang, R., y Qiu, B.-S. (2013). Inactivation of the *petE* gene encoding plastocyanin causes different photosynthetic responses in cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 under light-dark photoperiod and continuous light conditions.

FEMS Microbiol. Lett. 341, 106-114.

- Watanabe, M., y Ikeuchi, M. (2013). Phycobilisome: Architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth. Res.* 116, 265-276.
- Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F., y Leister, D. (2003). Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278, 31286-31289.
- Whitehead, L., Long, B.M., Price, G.D., y Badger, M.R. (2014). Comparing the in vivo function of α -carboxysomes and β -carboxysomes in two model cyanobacteria. *Plant Physiol.* 165, 398-411.
- Whitton, B.A., y Malcolm, P. (2000). Introduction to the Cyanobacteria. In *Personal Freedom through Human Rights Law?*, p.
- Williams, M.K., y Kantrowitz, E.R. (1992). Isolation and sequence analysis of the cDNA for pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase (amino acid sequence/allosteric enzyme). *Biochemistry* 89, 3080-3082.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- Wolk, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P., y Elhai, J. (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1561-1565.
- Wolosiuk, R.A., y Buchanan, B.O.B.B. (1977). Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266, 565-567.
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., y Poole, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40.
- Woodger, F.J., Bryant, D.A., y Price, G.D. (2007). Transcriptional regulation of the CO₂-concentrating mechanism in a euryhaline, coastal marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: Role of NdhR/CcmR. *J. Bacteriol.* 189, 3335-3347.
- Xie, W.Q., Jäger, K., y Potts, M. (1989). Cyanobacterial RNA polymerase genes rpoC1 and rpoC2 correspond to rpoC of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 1967-1973.
- Xu, N., Qiu, G.W., Lou, W.J., Li, Z.K., Jiang, H.B., Price, N.M., y Qiu, B.S. (2016). Identification of an iron permease, cFTR1, in cyanobacteria involved in the iron

- reduction/re-oxidation uptake pathway. *Environ. Microbiol.* *18*, 5005-5017.
- Xue, Y., Huang, S., Liang, J.Y., Zhang, Y., y Lipscomb, W.N. (1994). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 2,6-bisphosphate, AMP, and Zn²⁺ at 2.0-Å resolution: aspects of synergism between inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12482-12486.
 - Yagi, Y., y Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Front. Plant Sci.* *5*, 1-7.
 - Yan, C., y Xu, X. (2008). Bifunctional enzyme FBPase/SBPase is essential for photoautotrophic growth in cyanobacterium *Synechocystis* sp.PCC 6803. *Prog. Nat. Sci.*
 - Yang, C., Hua, Q., y Shimizu, K. (2002). Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ¹³C-labeled glucose. *Metab. Eng.* *4*, 202-216.
 - Yoo, S.H., Lee, B.H., Moon, Y., Spalding, M.H., y Jane, J.L. (2014). Glycogen synthase isoforms in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of different roles to produce glycogen by targeted mutagenesis. *PLoS One* *9*.
 - Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., y Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* *21*, 809-818.
 - Yoshida, K., Hara, S., y Hisabori, T. (2015). Thioredoxin selectivity for thiol-based redox regulation of target Proteins in Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *290*, 14278-14288.
 - Yoshitani, K., Hizukuri, Y., y Akiyama, Y. (2019). An in vivo protease activity assay for investigating the functions of the *Escherichia coli* membrane protease HtpX. *FEBS Lett.* *593*, 842-851.
 - You, L., Berla, B., He, L., Pakrasi, H.B., y Tang, Y.J. (2014). ¹³C-MFA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions. *Biotechnol. J.* *6*, 684-692.
 - Youvan, D.C., y Marrs, B.L. (1987). Molecular Mechanisms of Photosynthesis. *Sci. Am.* *256*, 42-48.
 - Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., y Lemaire, S.D. (2008). Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* *283*, 8868-8876.

- Zaffagnini, M., Fermani, S., Marchand, C.H., Costa, A., Sparla, F., Rouhier, N., Geigenberger, P., Lemaire, S.D., y Trost, P. (2019). Redox Homeostasis in Photosynthetic Organisms: Novel and Established Thiol-Based Molecular Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* *31*, 155-210.
- Zakar, T., Laczko-Dobos, H., Toth, T.N., y Gombos, Z. (2016). Carotenoids assist in cyanobacterial photosystem II assembly and function. *Front. Plant Sci.* *7*, 1-7.
- Zavřel, T., Očenášová, P., y Červený, J. (2017). Phenotypic characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLoS One* *12*, 1-21.
- Zhang, S., y Bryant, D.A. (2011). The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* (80-.). *334*, 1551-1553.
- Zhang, H.Z., Hackbarth, C.J., Chansky, K.M., y Chambers, H.F. (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in *Staphylococci*. *Science* (80-.). *291*, 1962-1965.
- Zhang, L., McSpadden, B., Pakrasi, H.B., y Whitmarsh, J. (1992). Copper-Mediated Regulation of Cytochrome-c553 and Plastocyanin in the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* *267*, 19054-19059.
- Zhang, L., Pakrasi, H.B., y Whitmarsh, J. (1994). Photoautotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the absence of cytochrome c553 and plastocyanin. *J. Biol. Chem.* *269*, 5036-5042.
- Zhang, R., Villeret, V., Lipscomb, W.N., y Fromm, H.J. (1996). Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry* *35*, 3038-3043.
- Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G.C., y Bryant, D.A. (2016). Natural and synthetic variants of the tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front. Microbiol.* *7*, 1-13.
- Zhou, J., Zhang, H., Meng, H., Zhu, Y., Bao, G., Zhang, Y., Li, Y., y Ma, Y. (2014). Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Sci. Rep.* *4*, 4500.