

---

# Estudio de los plásmidos SEVA para el desarrollo de nuevas herramientas de biología sintética en cianobacterias

---

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

---

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

Grado en Bioquímica por las Universidades de Sevilla y de Málaga

Curso 2023/2024

**Autor:** Pablo Sousa Sánchez

**Director:** Luis Gonzaga Heredia Martínez

**Tutor:** Luis López Maury

## Índice

1. Resumen .....	3
2. Introducción.....	4
2.1. Cianobacterias.....	4
2.2. Biología sintética .....	6
2.3. Métodos de movilización horizontal del ADN .....	8
2.4. Colecciones de plásmidos sintéticos: pSEVA.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Materiales y métodos.....	11
4.1. Organismos y condiciones de cultivo .....	11
4.2. Plásmidos y oligonucleótidos .....	13
4.3. Métodos de Biología Molecular .....	14
4.4. Transferencia de plásmidos en microorganismos .....	16
4.5. Análisis bioquímicos.....	19
4.6. Métodos bioinformáticos .....	20
5. Resultados.....	21
5.1. Viabilidad de pSEVA transferidos en <i>Synechocystis</i> .....	21
5.2. Transferencia del vector R6K en la estirpe de <i>Synechocystis pir</i> <sup>+</sup> .....	22
5.3. Creación de un plásmido sintético con el <i>oriR</i> RSF1010 y elementos SEVA.....	23
5.4. Transferencia de los nuevos plásmidos pSEVA 25 <sup>o</sup> 1 en <i>Synechocystis</i> .....	25
5.5. Conjugación de los nuevos plásmidos pSEVA 25 <sup>o</sup> 1 en <i>Anabaena</i> .....	26
6. Discusión .....	27
6.1. Perspectivas futuras .....	29
7. Referencias .....	30

## **1. Resumen**

Los vectores plasmídicos son uno de los sistemas más eficientes para la modificación genética en bacterias, pero existe una falta de estandarización de estas herramientas. La librería SEVA-DB es una iniciativa que promueve la utilización de plásmidos sintéticos basados en elementos modulables para facilitar el diseño de los dispositivos genéticos. Sin embargo, no existen publicaciones que estudien de forma sistemática su viabilidad en cianobacterias. En el presente trabajo se establecieron cuáles de estos vectores son más eficientes, mediante diferentes métodos de transferencia del ADN, en el organismo modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. De entre los siete plásmidos probados, sólo los basados en el origen de replicación RSF1010 presentaron colonias y en estas, la electroporación fue el método más eficiente. Adicionalmente, se diseñó un nuevo vector sintético adaptado al estándar SEVA y este presentó una ventaja conjugativa respecto a los disponibles en la librería. Estos nuevos plásmidos fueron viables tanto en el organismo modelo estudiado, como en la cianobacteria filamentos *Anabaena* sp. PCC 7120. Este trabajo desarrolla y expande la utilización de los plásmidos SEVA para establecer metodologías optimizadas con el fin de facilitar la biología sintética en cianobacterias.

## **2. Introducción**

### **2.1. Cianobacterias**

Las cianobacterias son organismos procariotas capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica y son un grupo filogenéticamente muy diverso. Estas eubacterias poseen fotosistemas similares a las algas y plantas superiores (Stanier & Cohen-Bazire, 2003), siendo considerados los ancestros de los cloroplastos en las células vegetales eucariotas según la teoría endosimbiótica (Yagi & Shiina, 2014). Constituyen el grupo de organismos fotosintéticos más abundante del planeta por lo que son importantes agentes en numerosos ciclos biológicos como el de carbono (Reyes-Prieto et al., 2007) y nitrógeno, ya que existen cianobacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Berman-Frank et al., 2003). Son las responsables de la formación de la atmósfera oxigénica (Fischer et al., 2016) y se les atribuye 2/3 de la producción primaria de los océanos, lo que equivale a la mitad de la producción global (García-Fernández et al., 2004).

Estas presentan una gran plasticidad metabólica, siendo capaces de crecer en condiciones fotoautótrofas, mixotróficas y fotoheterotróficas (Rippka, 1972), lo que les otorga una gran adaptabilidad. Además, el genoma de un gran número de cianobacterias ha sido secuenciado y publicado en bases de datos como BioCyc (Karp et al., 2019). Es por ello por lo que muchas cianobacterias se han establecido como modelos para estudiar la fotosíntesis y la fijación de carbono y nitrógeno.

#### **2.1.1. *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Este trabajo se ha realizado en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (en adelante *Synechocystis*) como organismo modelo. Esta es una especie unicelular no fijadora de nitrógeno que pertenece a la sección taxonómica I según Rippka et al., 1979. Presenta un genoma poliploide compuesto por un cromosoma circular de 3,57 Mb y 7 plásmidos de tamaños entre 119 y 2,2 kb (Kaneko et al., 2003). Fue la primera cianobacteria y primer organismo fotosintético cuyo genoma fue secuenciado (Kaneko et al., 1996) con un contenido en GC de un 47%. Tiene un tiempo de duplicación en crecimiento de 8 horas y es un gran modelo para estudios genéticos, puesto que es capaz de incorporar ADN exógeno mediante transformación natural e incorporarlo en su genoma por recombinación homóloga

(Porter, 1986). La capacidad de crecer heterotróficamente en ausencia de luz ha permitido una gran caracterización de los aparatos fotosintéticos ya que es posible estudiar mutantes de ambos fotosistemas (Williams, 1988). Su genoma también presenta ciertas similitudes con el del plasto con al menos 224 genes que comparten homología (Ikeuchi & Satoshi Tabata, 2001). Por lo tanto, es uno de los modelos más utilizados para el estudio del aparato fotosintético y diversas rutas metabólicas (Allaf & Peerhossaini, 2022).

### **2.1.2. *Anabaena* sp. PCC 7120**

Otro organismo utilizado durante la realización de este trabajo es la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 (en adelante *Anabaena*), que pertenece a la sección taxonómica IV según Rippka et al., 1979. Se caracteriza por ser una cianobacteria filamentosa que posee una diferenciación celular terminal en heterocistos capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Muro-Pastor & Hess, 2012), por lo que se utiliza como modelo para el estudio de este proceso. Su genoma consta de un cromosoma circular de 6,4 Mb y 6 plásmidos de entre 5,5 y 408 Kb y con un contenido en GC del 41% (Kaneko et al., 2001). Existen distintos métodos para introducir ADN exógeno en *Anabaena* como la conjugación triparental (Elhai & Wolk, 1988) o la electroporación (Thiel & Poo, 1989), aunque carece de la capacidad de ser transformada naturalmente.

### **2.1.3. Aplicaciones biotecnológicas en cianobacterias**

En el caso de las cianobacterias, existe un gran beneficio de utilizar estos organismos fotosintéticos por dos factores principales: lo primero es que pueden trabajar como biofactorías para la producción sostenible de compuestos de interés como combustibles, suplementos dietéticos, fertilizantes o biomateriales (Zahra et al., 2020). Lo segundo es que presentan una eficiencia fotosintética 10 veces mayor que en plantas superiores (Li et al., 2008), por lo que no tienen la necesidad de un sustrato costoso y contribuyen a convertir el CO<sub>2</sub> atmosférico en O<sub>2</sub>. Sin embargo, a diferencia de otros modelos biológicos más estudiados como *E. coli*, las cianobacterias son un grupo con menos herramientas genéticas desarrolladas. Esto hace que la velocidad de los estudios y sus posibles aplicaciones sean ralentizados por esta falta de infraestructura.

## 2.2. Biología sintética

La biología sintética es un campo de estudio basado en la “bioconvergencia”, que es la unión de varias disciplinas como la biología, la química, la ingeniería y las ciencias de la computación. Estas se combinan para dar lugar a los “re-writers” (Bensaude-Vincent, 2009), diseñadores que se rigen por el Dogma Central de la Biología Molecular para formar nuevos sistemas biológicos (Crick, 1970).

Para ello, toman fundamentos de la ingeniería, como es el desarrollo de métodos optimizados basados en una lista de mecanismos y materiales predefinidos (protocolos y secuencias de ADN para alterar los genomas), junto con un conjunto de normas que describen cómo se utilizan los distintos materiales en combinación y definen un comportamiento predecible. Así, empezaron a crearse los primeros dispositivos sintéticos (Monod & Jacob, 1961), hasta la formación de genomas con los mínimos genes esenciales (Glass et al., 2017).

El desarrollo de nuevas aproximaciones “ómicas”, que permiten la obtención de grandes cantidades de datos con los que establecer modelos sobre la regulación de los organismos, han provocado grandes avances y abierto nuevas perspectivas sobre los sistemas biológicos (Aizat et al., 2018). Conjuntamente, el aumento en la eficiencia de las herramientas de síntesis de ADN (Carlson, 2009), ha permitido un enfoque más sistémico sobre las alteraciones genómicas y la modificación de procesos biológicos.

La tendencia que esta disciplina ha desarrollado en las últimas décadas está basada en grupos de investigación aislados que han diseñado sus sistemas biológicos con criterios propios. Es por ello por lo que, debido a la falta de una estandarización de las herramientas disponibles, han aparecido iniciativas para homogeneizarlas como los BioBricks (Smolke, 2009). Estos son elementos genéticos funcionales predefinidos que son fácilmente intercambiables con el fin de acelerar y facilitar las modificaciones biológicas (Shetty et al., 2008). Otro de los proyectos destinados a estandarizar los sistemas de biología sintética ha sido la creación de un nuevo lenguaje denominado SBOL, que toma los principios de la ingeniería para facilitar la comunicación y acelerar el diseño de nuevos dispositivos (Galdzicki et al., 2014).

### **2.2.1. Nuevas plataformas de biología sintética en cianobacterias**

Existe un gran interés en desarrollar plataformas sintéticas funcionales en cianobacterias. Dado el contexto económico y medioambiental actual, que busca alternativas más sostenibles para la producción de ciertos compuestos de valor comercial (Zahra et al., 2020), muchas de estas propuestas están basadas en su adaptabilidad metabólica para crear fábricas celulares (Lindblad et al., 2019). Sin embargo, el rendimiento de la producción ha sido relativamente bajo en comparación con otros modelos como *E. coli* o levaduras. Una de las razones que explican esto es la escasez de elementos reguladores disponibles que son capaces de modificar específicamente la fisiología de la célula.

No obstante, existen grandes avances en este campo en los últimos años. Estos se centran en la caracterización y optimización de elementos reguladores como promotores, sitios de unión al ribosoma o riboswitches (Sengupta et al., 2018). También se han desarrollado herramientas para la edición e integración cromosómica de genes mediante la utilización de vectores y sistemas CRISPR-Cas, que permiten modificar todas las copias cromosómicas y alterar genomas (Wang et al., 2020).

### **2.2.2. Vectores en la biología sintética de cianobacterias**

Los vectores son un vehículo para introducir alteraciones genéticas en los organismos. Estos son capaces de portar genes de resistencia frente a factores selectivos y a condiciones de estrés o de insertar genes para la expresión de proteínas de interés y elementos reguladores. Los vectores replicativos, que permanecen externos al genoma, tienen una gran utilidad en la expresión temporal de genes y son idóneos para formar dispositivos sintéticos complejos (Lee et al., 2011). Estos elementos pueden ser modificados u optimizados *in vitro* o *in vivo*, posibilitando el uso de colecciones de BioBricks ya creados.

Sin embargo, las cianobacterias forman un grupo filogenéticamente muy diverso, por lo que la aplicabilidad de los vectores en muchos de estos microorganismos no siempre es la deseada. Los vectores basados en BioBricks permiten insertar sistemas muy optimizados, ya que son comunes entre filos, pero con una modularidad en la que se sustituye el origen de replicación y los elementos de transferencia del plásmido para una mayor adaptabilidad. La búsqueda de un vector de alto número de copias, funcional en diferentes modelos y con protocolos estandarizados es de gran interés en la industria.

### 2.2.3. Orígenes de replicación en cianobacterias

Entre los vectores más utilizados en el campo, existe un gran número de orígenes de replicación. Uno de los más extendidos en cianobacterias, y en particular en *Synechocystis*, es el RSF1010 (Mermet-Bouvier et al., 1993), que es viable en diversas bacterias gram(-). Tiene un tamaño de 8,6 kb y se replica en un bajo número de copias (Marraccini et al., 1993). Presenta una replicación por desplazamiento de hebras dependientes de las proteínas RepBAC (Scherzinger et al., 1984). Debido a la actividad de estas tres proteínas, la replicación es independiente al mecanismo de transcripción del huésped, lo que podría favorecer su capacidad de amplio rango (Kües & Stahl, 1989).

Otros de los orígenes de replicación más utilizados son los presentes en el plásmido pDU1, cuya región mínima para replicarse es de apenas 1,3 Kb (Jin et al., 2018) y en el plásmido pANS, que produce el mayor número de copias por célula respecto a los dos anteriores (Chen et al., 2016). Estos tres plásmidos son además compatibles entre sí.

## 2.3. Métodos de movilización horizontal del ADN

### 2.3.1. Transformación

Ciertas estirpes bacterianas son capaces de integrar un vector exógeno mediante transformación natural, como es el caso de *Synechocystis* (Vermaas, 1996). El mecanismo por el cual es capaz de introducir ADN exógeno es aún desconocido, pero se sabe que sus *pilis* de tipo IV son esenciales para la transformación (Oeser et al., 2021).

### 2.3.2. Conjugación

Es un método de transmisión de material genético mediante un contacto célula-célula. El ADN se moviliza debido a 3 módulos proteicos especializados:

- El relaxosoma: está constituido por el origen de transferencia (*oriT*) y proteínas involucradas en el reconocimiento y procesamiento del ADN que se va a transferir.
- MPF: complejo multiproteico formador del par conjugativo que establece uniones físicas mediante *pilis* entre de la célula donadora, con componentes de la superficie de la célula receptora (Fernández López, 2015).
- Complejo acoplador (T4CP): comunica el relaxosoma con el MPF.



### 2.3.3. Electroporación

No todas las cianobacterias poseen competencia para la transformación natural, por lo que deben utilizarse distintas estrategias para incorporar los plásmidos (Vioque, 2007). La electroporación es un método que introduce directamente el ADN en la célula mediante el uso de pulsos eléctricos de gran intensidad que permeabilizan la membrana bacteriana, permitiendo la entrada de moléculas de ADN exógeno (Cadoret et al., 2014).

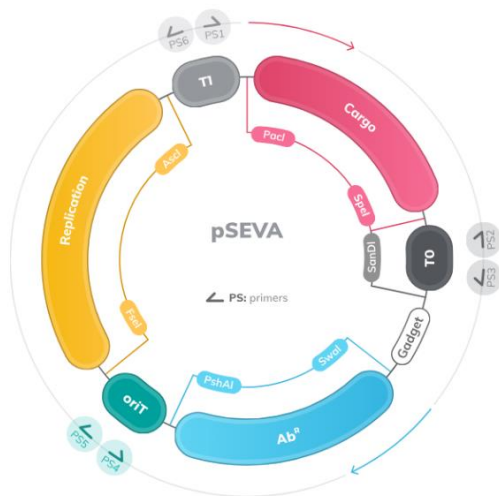
### 2.4. Colecciones de plásmidos sintéticos: pSEVA

La “Standard European Vector Architecture Database” (SEVA-DB, <http://seva.cnb.csic.es>) es una de estas propuestas que crea un repositorio de elementos estandarizados y de libre uso, organizados por una nomenclatura numérica (Silva-Rocha et al., 2013). Se busca adoptar materiales y metodologías comunes para trabajar eficientemente bajo unos mismos parámetros y que los resultados sean más fidedignamente comparables. En esta, se pueden elegir una serie de vectores modulables optimizados y fáciles de manipular para su uso en organismos procariotas, no sólo en organismos modelos. Los elementos genéticos funcionales son completamente intercambiables para adaptarse a las necesidades del organismo, adoptando un lenguaje propio (SEVA standard).

Todos los módulos disponibles en la colección han sido modificados, eliminando los posibles defectos estructurales o funcionales y sustituyendo sitios de restricción comunes por únicos para facilitar el intercambio entre módulos. Además, han sido minimizados para disminuir el tamaño final del vector, lo que puede ser un factor limitante según el organismo y método utilizado (Yoshida & Sato, 2009). También, han diseñado 6 oligonucleótidos cuyas secuencias complementarias están presentes en todos los vectores con el fin de secuenciar o detectar la presencia de los módulos. Por último, se han introducido secuencias que posibilitan el ensamblaje de los vectores mediante recombinación homóloga con métodos de clonación más eficientes como el Golden Gate Cloning (Engler & Marillonnet, 2014).

Los plásmidos SEVA (pSEVA) están organizados en módulos funcionales flanqueados por sitios de restricción específicos. Se distinguen tres elementos principales (Figura 1): gen de resistencia a antibiótico, módulo cargo, que contiene un sitio de clonación múltiple, y el origen de replicación (*oriR*), que proviene de plásmidos de amplio rango de huéspedes. Estos son viables en un gran número de estirpes bacterianas y tienen la capacidad

de funcionar en los modelos de clonación genética como *E. coli*. El *oriR* contiene los elementos mínimos para la iniciación de la replicación, como son un origen de replicación vegetativo (*oriV*) y proteínas replicativas (Rep) con sus respectivos promotores.



**Figura 1. Estructura de los plásmidos SEVA (pSEVA).**

Todos contienen tres módulos básicos: un gen de resistencia a antibióticos o Ab<sup>R</sup> (azul), un cargo (magenta) y un origen de replicación (amarillo). Estos están flanqueados por sitios de restricción únicos y específicos. Tres conectores invariables dividen cada módulo: dos secuencias terminadoras, que aíslan transcripcionalmente al cargo (T0 y T1) y un origen de transferencia (*oriT*). Seis oligonucleótidos (PS1-6) alinean con estos conectores para detectar y amplificar los módulos (SEVA-DB).

Los pSEVA son de tipo movilizables, ya que portan únicamente los componentes del relaxosoma y requieren que los otros elementos estén integrados en la célula donadora para su conjugación (Smillie et al., 2010). Estas presentan un origen de transferencia (*oriT*) invariable proveniente del plásmido de amplio rango RP4 (Lyras & Rood, 1998). Su secuencia contiene un sitio *oriT* que sufre un corte por las proteínas Tra, presentes en la célula donadora. El ADN entrará en la célula huésped como cadena simple, donde será replicado por círculo rodante (Pansegrau et al., 1990). Esta maquinaria de conjugación es muy eficiente y sirve tanto para estirpes gram(-) como gram(+) (Pansegrau et al., 1990), lo que permite la transferencia de plásmidos en organismos donde no hay protocolos alternativos.

### **3. Objetivos**

- 1) Identificar plásmidos de la colección SEVA funcionales en *Synechocystis*.
- 2) Establecer el método de transferencia de los pSEVA más eficiente en *Synechocystis*.
- 3) Diseñar a partir del pSEVA nuevos plásmidos con una mayor eficiencia.
- 4) Demostrar la modularidad de los plásmidos pSEVA y la capacidad de ser transferidos a otras cianobacterias como *Anabaena*.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Organismos y condiciones de cultivo**

#### **4.1.1. Cianobacterias**

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) y *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Anabaena*) utilizadas en el presente trabajo (Tabla 1), fueron cultivadas en medio BG11 (Rippka et al., 1979) fotoautotóricamente a 30 °C bajo luz continua (50  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Para favorecer el crecimiento de las estirpes de *Synechocystis* se usó BG11c\* (Tabla 2). Se utilizaron tanto las estirpes silvestres de las dos cianobacterias como una estirpe de *Synechocystis* que porta el gen *pir*, un regulador esencial en la replicación del plásmido R6K (York et al., 1992).

**Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo**

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Silvestre (WT)	Colección del laboratorio
<i>Synechocystis pir</i> <sup>+</sup>	<i>nrsD::Ptrc:pir:Nat</i> <sup>R</sup>	López-Maury, L (no publicado)
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Silvestre (WT)	Colección del laboratorio

**Tabla 2. Composición del medio BG11**

NaNO <sub>3</sub>	17,8 mM	MnCl <sub>2</sub>	9,1 $\mu\text{M}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,20 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1,6 $\mu\text{M}$
MgSO <sub>4</sub>	0,30 mM	ZnSO <sub>4</sub>	0,8 $\mu\text{M}$
CaCl <sub>2</sub>	0,24 mM	CuSO <sub>4</sub>	0,3 $\mu\text{M}$
Citrato Fe/NH <sub>4</sub> (17%)	6 mg/L	CoCl <sub>2</sub>	0,2 $\mu\text{M}$
Na <sub>2</sub> -EDTA	2,4 $\mu\text{M}$	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46 $\mu\text{M}$

\*BG11c: Medio BG11 suplementado con 12 mM de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>.

Los cultivos en medio sólido se suplementaron con 1% (p/v) de agar (Bacto-Agar, Difco). Para las estirpes resistentes a antibióticos, el medio de cultivo se suplementó con la siguiente concentración final de antibióticos: cloranfenicol (Cm) 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , espectinomicina (St) 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , espectromicina (Sp) 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , kanamicina (Km) 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , neomicina (Nm) 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y nourseotricina (Nat) 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Bacterias

Para llevar a cabo tanto la clonación genética de los plásmidos como la conjugación de las cianobacterias del estudio, se utilizaron distintas estirpes de *E. coli* (Tabla 3).

**Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo**

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 $\alpha$	F-, endA1, hsdR17 (mK+,rK-) supE44, thi-1 recA1 gyrA96 relA1 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80-lacZ $\Delta$ M15)	(Hanahan, 1983)
ED8654	lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514 (rk- mk-) recA56 mcrA1 metB1 lacY galK2 galT22 trpR55 pRL443 Amp <sup>R</sup>	(Elhai & Wolk, 1988)
HB101 pRL623	F- hsdS20 (rB-mB-) leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB pRL623 Cm <sup>R</sup>	(Elhai & Wolk, 1988)

Las diferentes estirpes de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) (Tabla 4) a 37 °C y en agitación a 200 rpm.

**Tabla 4. Composición del medio LB**

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

Para los cultivos en medio sólido, se adicionó 1,5% (p/v) de agar (Bacto-Agar, Difco). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a la siguiente concentración final: ampicilina

(Amp) 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , cloranfenicol (Cm) 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , espectinomycin (St) 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , espectromycin (Sp) 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y kanamicina (Km) 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

## 4.2. Plásmidos y oligonucleótidos

Se emplearon plásmidos de la librería pSEVA (SEVA-DB, <http://seva.cnb.csic.es>), así como los plásmidos diseñados de este trabajo (Tabla 5).

**Tabla 5. Lista de plásmidos utilizados**

Plásmido	Descripción	Ab <sup>R</sup>	Referencia
pSEVA 251	Vector pSEVA, <i>oriV</i> RSF1010 y MCS	Km	SEVA-DB
pSEVA 351	Vector pSEVA, <i>oriV</i> RSF1010 y MCS	Cm	SEVA-DB
pSEVA 411	Vector pSEVA, <i>oriV</i> R6K y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 421	Vector pSEVA, <i>oriV</i> RK2 y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 441	Vector pSEVA, <i>oriV</i> pRO1600/ColE1 y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 451	Vector pSEVA, <i>oriV</i> RSF1010 y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 481	Vector pSEVA, <i>oriV</i> pUC y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 48b1	Vector pSEVA, <i>oriV</i> pUC/SCP2 y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pSEVA 48c1	Vector pSEVA, <i>oriV</i> pUC/pIJ101 y MCS	St/Sp	SEVA-DB
pRL443 Amp <sup>R</sup>	Plásmido derivado de RP4 necesario para la conjugación	Amp	Colección del laboratorio
pIL_J23100	Vector basado en pSDHY, <i>oriR</i> RSF1010 original y mVenus con promotor J23100	Cm	(Mager et al., 2023)
pSEVA 25°1 V1 V2	Nuevo plásmido sintético, MCS y gen de resistencia pSEVA, <i>oriR</i> RSF1010 original	Km	Este trabajo

Las características y usos de los oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados**

Nº	Nombre	Secuencia	Función
1	5_ <i>nrsD</i> _BssHII_F	aagcgcgcctttcaactgcttgcggaacc	Amplificación del gen <i>nrsD</i>
2	3_ <i>nrsD</i> _BssHII_R	aagcgcgcctcggagtcattggtgatggg	
3	SEVA_primer (R24)	agcggataacaatttcacacagga	Amplificación del MCS de los pSEVA
4	SEVA_primer (F24)	cgccagggttttccagtcacgac	
5	<i>pir</i> _R_ <i>Xho</i> I	gactctcgaggactctagtatatcacc	Amplificación del gen <i>pir</i> adyacente al <i>nrsD</i>
6	RSF1010_R_ <i>Xho</i> I	catgctcgagcactcccgtactaactgtc	Amplificación del RSF1010 original
7	RSF1010_F_ <i>Asc</i> I_ <i>Xho</i> I	catgctcgaggcgcgccgagcagaagagcat acatc	
8	MCS_SEVA_F_ <i>Xho</i> I	catgctcgaggcgcgccagctgtctagggc	Amplificación del MCS y gen Km <sup>R</sup> del pSEVA
9	MCS_SEVA_R_ <i>Xho</i> I	catgctcgaggacaacgcgcggaccgcggtc	
10	RSF1010_ <i>oriT</i> _R	tgatcgaccgagacaggccctgcg	Amplificación del <i>oriT</i> del RSF1010

### 4.3. Métodos de Biología Molecular

#### 4.3.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Los plásmidos recombinantes fueron aislados de cultivos de *E. coli* crecidos en condiciones selectivas, que portaban los plásmidos de interés (Tabla 5). Se recogió biomasa de los cultivos (una mayor cantidad para los plásmidos de bajo número de copias como RSF1010), para realizar una lisis alcalina según Birnboim en 1983. A continuación, se procedió con una purificación utilizando el kit FavorPrep<sup>TM</sup> GEL/PCR Purification Mini Kit de Biotech Corp., siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se cuantificó la concentración de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

### **4.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa**

Todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). La amplificación de fragmentos para su uso en biología molecular se llevó a cabo con la polimerasa Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El programa seleccionado para la amplificación de los fragmentos de ADN se detalla a continuación:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto.
- 34 ciclos de reacción que constaba de una etapa de desnaturalización del ADN a 98 °C durante 1 minuto, seguido de una etapa de renaturalización del ADN de entre 50-65 °C (según los oligonucleótidos utilizados) durante 30 segundos y una etapa de polimerización a 72 °C durante 45 segundos por cada Kb a amplificar.
- Un ciclo final de polimerización a 72 °C.

Para confirmar la presencia del plásmido en las diferentes estirpes seleccionadas se realizaron PCR de colonias utilizando la polimerasa DreamTaq Polymerase (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **4.3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para separar el ADN según su tamaño y su carga, se realizaron electroforesis en geles de agarosa. El protocolo se llevó a cabo según lo descrito por Sambrook en 1989, utilizando geles de agarosa entre 0,5-2% (p/v) preparados en tampón TBE 0,5X (Tris borato 45 mM y EDTA 1mM, pH 8.0). Antes de la gelificación se añadió un agente intercalante de ADN (RedSafe 20.000X, iNtRON Biotechnology) y se usó un molde Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad). Para migrar la muestra de ADN en el gel se utilizó una fuente eléctrica PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad). Se añadió a cada muestra tampón de carga (Gel Loading Dye Purple 6X, New England Biolabs) y se cargaron 5 µl de marcador de peso molecular (SiZer™-1.000 plus DNA marker, iNtRON Biotechnology) en el gel. Tras finalizar la electroforesis, el gel se reveló en un transiluminador Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

#### **4.3.4. Purificación de ADN de geles de agarosa**

Tras una electroforesis en gel de agarosa, se reveló el gel utilizando luz UV y se cortaron las bandas de interés. El aislamiento del ADN de dichas bandas de agarosa se llevó a cabo mediante el uso del kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit de Biotech Corp., siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.3.5. Manipulación enzimática del ADN**

Para la construcción y modificación de los plásmidos sintéticos se trató enzimáticamente el ADN como se describe en Sambrook, 1989. Todas las enzimas empleadas se suministraron por New England Biolabs y se utilizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **4.3.6. Secuenciación del ADN**

El cultivo de *E. coli* transformado con el plásmido sintético se cultivó en medio selectivo. Posteriormente se aisló el ADN plasmídico (como se describe en el apartado 4.3.1) para comprobar las secuencias de ADN y la presencia del inserto mediante secuenciación. Esta se llevó a cabo con el servicio comercial de StabVida (Portugal).

### **4.4. Transferencia de plásmidos en microorganismos**

#### **4.4.1. Transformación de *E. coli***

Se transfirieron los plásmidos de interés a las estirpes de células competentes DH5 $\alpha$  y HB101. Se añadieron 20  $\mu$ l de plásmido en 100  $\mu$ l de células competentes mantenidas en hielo. A continuación, se llevó a cabo un choque térmico de 10 minutos en hielo, 1 minuto a 42 °C y 2 minutos nuevamente en hielo. Después se añadieron 900  $\mu$ l de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se sembró todo el volumen en placas con medio LB selectivo y se incubó a 37 °C 24 horas. Las colonias crecidas se pasaron a una placa con medio LB selectivo y crecieron hasta su posterior comprobación.



#### 4.4.2. Transformación de *Synechocystis*

Este método es una modificación del descrito anteriormente por Chauvat et al. en 1986. Los cultivos líquidos en fase exponencial se centrifugaron a 4.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para ser lavados 2 veces al descartar el sobrenadante y resuspender en 50 ml de medio BG11c. Tras el segundo lavado, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio BG11c y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ l, en tubos de poliuretano de 10 ml, y se añadieron los plásmidos purificados tratando de igualar la concentración final (10-20  $\mu$ g de ADN).

Después se incubó la mezcla de células y ADN durante 2-3 horas a 30 °C y en condiciones estándar de iluminación (50  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Posteriormente, se sembraron las células en una placa Petri de 25 ml de medio BG11c no selectivo sobre filtros de nitrocelulosa 0,45  $\mu$ m (IMMOBILON-NC). Tras 20 horas en estas condiciones de crecimiento, se transfirieron los filtros a otra placa con medio BG11c selectivo con los antibióticos apropiados. Las colonias transformadas aparecieron en un periodo de 7-10 días.

#### 4.4.3. Conjugación de *Synechocystis*

Se realizó el método de conjugación triparental descrito por Thiel & Peter Wolk en 1987. Se incubaron las cepas de *E. coli* portadoras del plásmido a insertar en 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado, así como la estirpe ED8654, que porta el plásmido pRL443 con los elementos necesarios para la conjugación (Tabla 3).

Se diluyeron los cultivos crecidos durante 24 horas a 37 °C 1:100 en 10 ml de medio no selectivo (100 ml para la estirpe ED8654) y crecieron durante 2 horas en las mismas condiciones. Después, se recogieron los cultivos mediante centrifugación a 2.500 g durante 8 minutos, para luego resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de medio LB (se resuspenderán el mismo número de alícuotas de la ED8654 por el número de conjugaciones a realizar). Posteriormente, se dividieron alícuotas de 0,5 ml de cepa ED8654 con 0,5 ml de la cepa portadora del plásmido de interés. Se centrifugó a 2.500 g durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ l de medio LB para incubar a 30 °C durante 2 horas sin movimiento.

Posteriormente, se añadieron 30  $\mu$ l de cultivo de *Synechocystis* concentrado (10  $\mu$ g de clorofila) a cada alícuota de conjugación. Se extendió la mezcla sobre filtros de nitrocelulosa 0,45  $\mu$ m (IMMOBILON-NC) en placas de 25 ml con medio BG11c

suplementado con 5% de medio LB sin antibióticos y se incubaron en las condiciones anteriormente descritas. Después de 24 horas de crecimiento, se transfirió el filtro de nitrocelulosa a una placa con medio BG11c con el antibiótico apropiado y se incubó en luz entre 7-10 días hasta que se pudieron identificar colonias y se murieron las *E. coli*.

#### **4.4.4. Electroporación de *Synechocystis***

El protocolo utilizado es una variación de Ludwig et al., 2008. Se centrifugaron 25 ml de cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento a 3.200 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 5 ml de tampón ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperacil) etanosulfónico (HEPES) pH 7,5 a una concentración de 1 mM, previamente preparado en frío y esterilizado con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (Biofil). Tras 2 lavados, se resuspendió el pellet en alícuotas de 100 µl de HEPES y se incubó con 1 µg de plásmido en frío.

La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 0,2 mm (Gene Pulser/MicroPulser Electroporation Cuvettes, Bio-Rad) y se electroporó con el aparato MicroPulser Electroporator (Bio-Rad) con un capacitor de 15-µF, a 2.500 V y con una constante de tiempo variable entre 4 y 6 ms. Inmediatamente tras el pulso, se recuperó con 400 µl de BG11c y se sembraron las células electroporadas sobre filtros de nitrocelulosa 0,45 µm (IMMOBILON-NC) en placas con 25 ml de medio BG11c no selectivo. Tras un día de crecimiento, el filtro se transfirió a una nueva placa con el antibiótico apropiado y se incubó entre 7-10 días hasta que se aprecien las colonias.

#### **4.4.5. Conjugación de *Anabaena***

Este protocolo está basado en la conjugación triparental mediante el uso de un plásmido conjugativo de amplio espectro según Elhai & Wolk en 1988. Se utilizaron una primera estirpe de *E. coli* HB101, que porta un vector auxiliar pRL623 para la metilación del ADN a transferir, y otra estirpe de *E. coli* ED8654, que porta el plásmido conjugativo pRL443 que contiene los genes para codificar el aparato conjugativo (Tabla 3).

Primero, se transformó la estirpe HB101 con el plásmido cargo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.1. Este cultivo, como el de la otra estirpe, fueron incubados a 37 °C en agitación el día anterior a la conjugación en 3 ml de medio LB para que las células

estuvieran en fase exponencial. Tras esto, se inocularon 250  $\mu\text{l}$  (para pRL443) y 300  $\mu\text{l}$  (para la estirpe con el plásmido cargo) de los cultivos en 10 ml de medio LB con los antibióticos apropiados y se incubó en las mismas condiciones durante 2,5 horas.

Posteriormente, se realizó la conjugación de pRL443 desde ED8654 a HB101. Para ello, previamente se retiraron los antibióticos de los cultivos al ser lavados dos veces mediante centrifugación y resuspendiendo en 15 ml de medio LB. Finalmente, se resuspendió en 5 ml de medio LB y se combinaron ambos cultivos para ser recogidos por centrifugación y resuspendidos en 60  $\mu\text{l}$  de medio. Las dos estirpes se incubaron juntas a 30 °C sin agitación durante 2,5 horas y tras esto, se combinaron con un inóculo concentrado de *Anabaena* (10  $\mu\text{g}$  de clorofila) en un volumen máximo de 200-300  $\mu\text{l}$ . Se extendió la mezcla sobre filtros estériles de nitrocelulosa 0,45  $\mu\text{m}$  (IMMOBILON-NC) en placas Petri con medio BG11 suplementado con 5% de LB (v/v) y fueron incubadas a 30 °C a baja intensidad lumínica durante 1-2 horas y después a alta intensidad.

Al siguiente día, se transfirieron los filtros a placas Petri con medio BG11 y tras 24 horas, se pasaron a placas Petri con medio BG11 y medio selectivo (con el antibiótico apropiado). Cada 2 días se transfirió el filtro a una nueva placa con medio selectivo con el objetivo de eliminar a *E. coli* y las cianobacterias que no habían incorporado el plásmido.

## 4.5. Análisis bioquímicos

### 4.5.1. Determinación de la concentración de clorofila

La concentración de clorofila es una medida que permite determinar el número de células en un cultivo de forma espectrofotométrica (Mackinney, 1941). Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  del inóculo y se añadieron 950  $\mu\text{l}$  de metanol absoluto. La mezcla se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 13.000 g durante 2 minutos. Posteriormente se midió la densidad óptica del sobrenadante en un espectrofotómetro Jasco V-650 (Jasco Analítica Spain, S.L.) a una longitud de onda de 665 (Yéprémian et al., 2016):  $\text{Chl total } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{665} \times 13,45$

#### 4.5.2. Medida de la densidad óptica

Para medir el grado de crecimiento de los cultivos de cianobacterias, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Jasco V-650 (Jasco Analítica Spain, S.L.).

#### 4.6. Métodos bioinformáticos

Se utilizaron distintas bases de datos y softwares para el procesamiento de datos. Las secuencias de los plásmidos se obtuvieron del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del SEVAhub (<http://sevahub.es/>).

Se realizaron diversos análisis *in silico* con el software SerialCloner 2.6.1 ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)). En este, se visualizaron las regiones anotadas de los plásmidos, se observaron las localizaciones de las dianas de restricción en las secuencias de ADN, se diseñaron y predijeron las PCRs, se analizaron los resultados de la secuenciación y se diseñaron los plásmidos sintéticos. Los protocolos de restricción se obtuvieron de la plataforma NEBcloner (<https://nebcloner.neb.com>) de New England Biolabs.

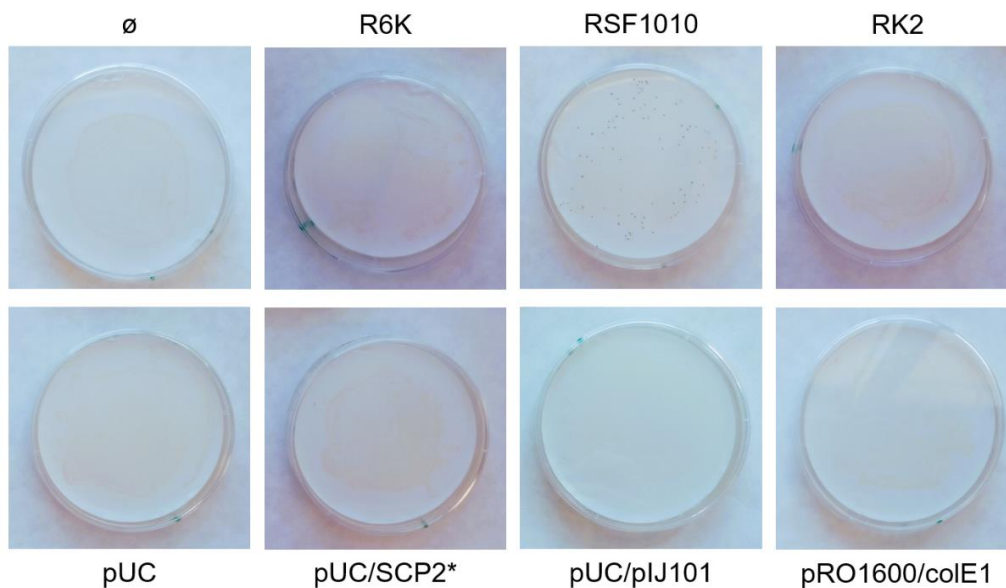
## 5. Resultados

### 5.1. Viabilidad de pSEVA transferidos en *Synechocystis*

La librería de plásmidos SEVA tienen un uso extendido en distintas bacterias gram(-), pero no existe ningún estudio que haya comprobado su viabilidad en *Synechocystis* de forma sistemática y con varios métodos de transferencia.

Con el fin de buscar nuevos vectores con diferentes *oriR*, se estudió la capacidad replicativa de diversos pSEVA (Tabla 5) en *Synechocystis*, tras ser transferidos mediante transformación, conjugación y electroporación al menos en dos ocasiones. Los plásmidos probados se diferencian únicamente en el *oriR*: R6K, RSF1010, RK2, pUC, pUC/SCP2, pUC/pIJ101 y pRO1600/ColE1. Estos son de amplio rango de huésped, a excepción del R6K que es de bajo rango, con un tamaño y número de copias variables. Todos los plásmidos presentan una resistencia a antibiótico y son capaces de replicarse en *E. coli*, de dónde fueron conjugados o aislados para la transformación y electroporación.

Los cultivos con los plásmidos transferidos se cultivaron con el antibiótico al cual presentan resistencia, por lo cual deben replicarse y expresar el respectivo gen para poder crecer. En ninguna ocasión se obtuvieron colonias resistentes a los antibióticos a excepción de los que portan un *oriR* RSF1010, que crecieron con los tres métodos de transferencia.



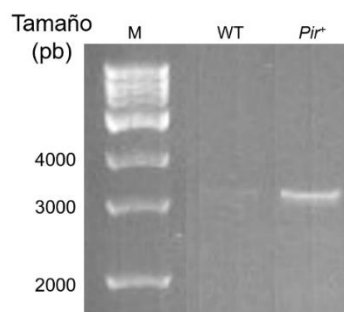
**Figura 2. Crecimiento de colonias en cultivos de *Synechocystis* WT conjugados con los pSEVA.** Estos crecieron en medio BG11c con el antibiótico al cual son resistentes. En los cultivos sin vector ( $\emptyset$ ), y con el resto de pSEVA no aparecieron colonias, a excepción del que portaba el *oriR* RSF1010. Esto fue representativo de la transformación y electroporación.

Adicionalmente, se observó que el sistema de transferencia que produjo un mayor número de colonias, en los cultivos que crecieron con los plásmidos con RSF1010, fue la electroporación, seguido por la transformación y conjugación con resultados semejantes.

Por último, se comparó la eficiencia y mantenimiento mediante transformación de plásmidos con el *oriR* RSF1010, pero utilizando diferentes genes de resistencia a antibióticos para descartar su influencia en el crecimiento: pSEVA 251 (Km<sup>R</sup>), pSEVA 351 (Cm<sup>R</sup>) y pSEVA 451 (St/Sp<sup>R</sup>) (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas en el número de colonias obtenidas. La presencia del plásmido en todos los cultivos crecidos se verificó mediante PCR con los oligonucleótidos 3 y 4 (Tabla 6).

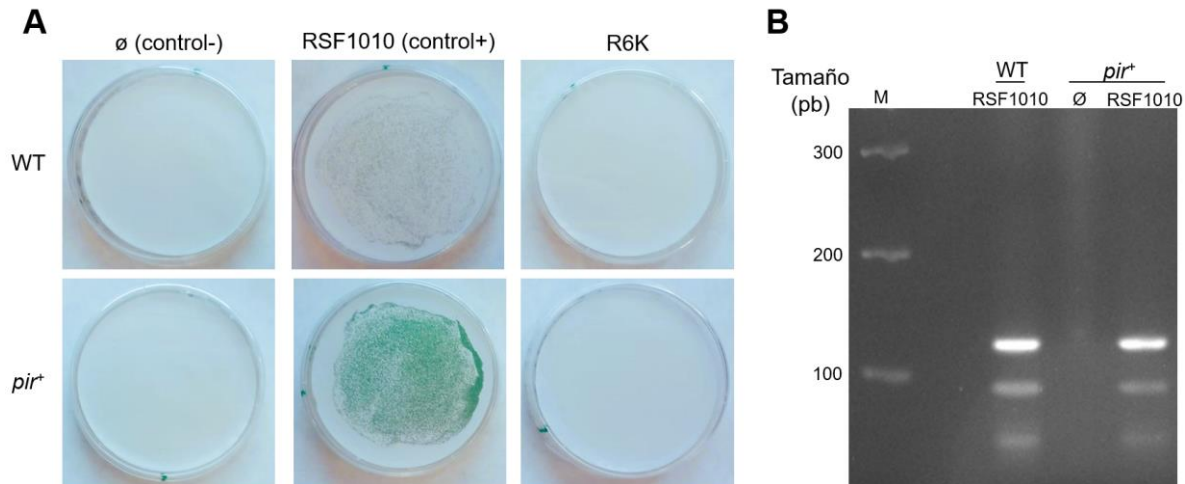
## 5.2. Transferencia del vector R6K en la estirpe de *Synechocystis pir*<sup>+</sup>

Los plásmidos con un *oriR* R6K necesitan de una estirpe que exprese el gen *pir* en *trans* para su replicación (Kolter et al., 1978). Por ello, se utilizó una estirpe de *Synechocystis* de la colección del laboratorio capaz de expresar el gen *pir* (Tabla 1): esta se generó por recombinación homóloga de la secuencia del gen *nrsD*, implicado en la resistencia a níquel (García-Domínguez et al., 2000). La secuencia contiene el promotor constitutivo en *Synechocystis Ptrc* (Camsund et al., 2014), que controla la expresión del *pir* y de un gen de resistencia a Nourseotricina (Nat). La estirpe fue confirmada mediante PCR (Figura 3) con los oligonucleótidos 1 y 2 (Tabla 6).



**Figura 3. Electroforesis confirmativa de la PCR de la estirpe *Synechocystis pir*<sup>+</sup>.** Se localiza la amplificación de la secuencia *nrsD::Ptrc:pir:Nat*<sup>R</sup> (3293 pb) en la estirpe *pir*<sup>+</sup>, mientras que no hubo amplificación en el WT.

Se transfirió el plásmido pSEVA411 con *oriR* R6K y el pSEVA 451 con *oriR* RSF1010 (Tabla 5), cómo control positivo, en las estirpes de *Synechocystis* WT y *pir*<sup>+</sup> (Tabla 1), que crecieron en medio selectivo (Figura 4A). Aparecieron colonias en las dos estirpes con plásmidos con RSF1010, pero ninguna con el R6K. La presencia del plásmido en las colonias fue confirmada mediante PCR (Figura 4B) con los oligonucleótidos 3 y 4 (Tabla 6).



**Figura 4. Estudio de la viabilidad de los pSEVA con R6K mediante su transferencia en estirpes de *Synechocystis* WT y *pir*<sup>+</sup>.** (A) Electroporación de los plásmidos en las dos estirpes de *Synechocystis*. Los cultivos con el pSEVA 451 (RSF1010) presentaron colonias en ambas estirpes. En los cultivos sin vector (∅) y con el pSEVA 411 (R6K) no hubo crecimiento. Esto fue representativo de la transformación y la conjugación. (B) Electroforesis confirmativa de la PCR de colonias del MCS amplificado de los pSEVA (135 pb) en estirpes de *Synechocystis* WT y *pir*<sup>+</sup>. Esto fue representativo del resto de confirmaciones.

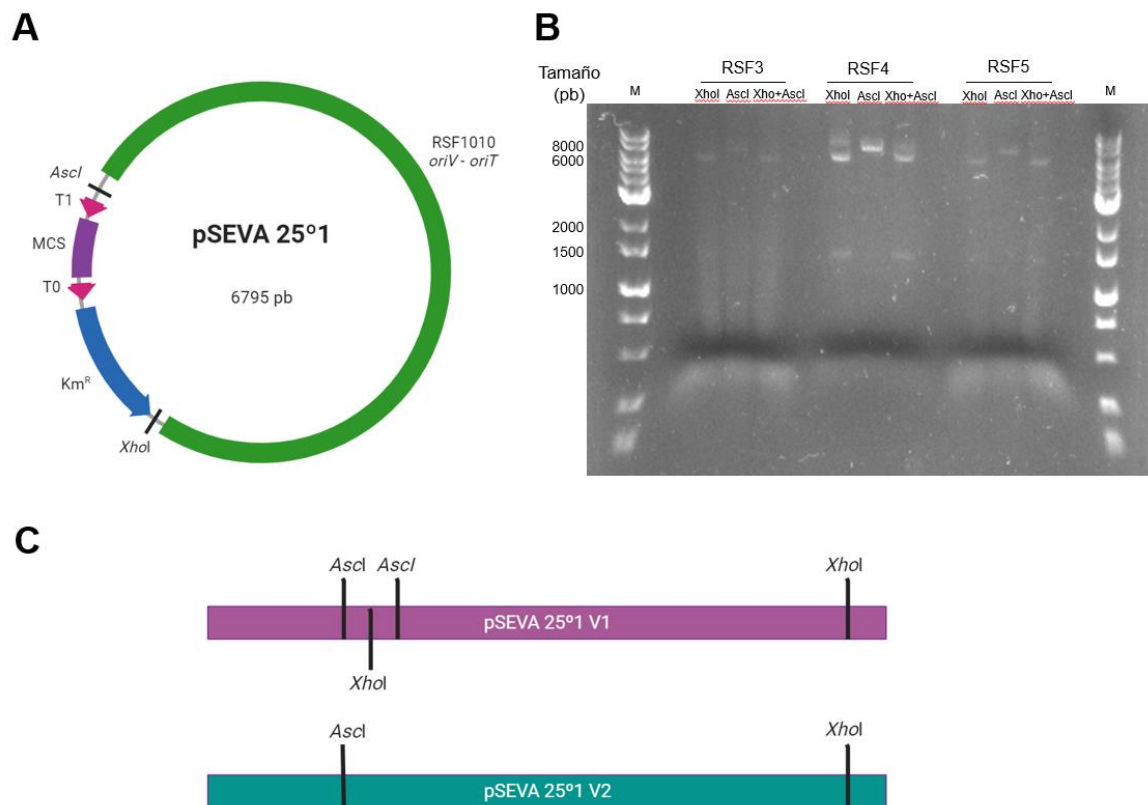
### 5.3. Creación de un plásmido sintético con el *oriR* RSF1010 y elementos SEVA

En experimentos anteriores (no publicados) se observó que la eficiencia de la conjugación de los pSEVA 451 era menor que en otros plásmidos con un *oriR* RSF1010 sin modificar (RSF1010 original). Por ello, se diseñó un nuevo plásmido sintético denominado pSEVA 25°1, adaptado al estándar SEVA, con el software SerialCloner 2.6.1. Este plásmido contiene el *oriR* RSF1010 original, con el sitio de restricción múltiple (MCS) y el gen de resistencia a antibiótico flanqueados por sitios de restricción *AscI* y *XhoI* (Figura 5A).

Para obtenerlo, se amplificó mediante PCR el *oriR* RSF1010 original del pIL\_J23100 (Mager et al., 2023) (Tabla 5), con los oligonucleótidos 6 y 7 (Tabla 6). También se amplificó el MCS y el gen de resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>) del pSEVA251 (Silva-Rocha et al., 2013), con los oligonucleótidos 8 y 9. Los dos fragmentos generados se comprobaron mediante electroforesis y se aislaron por separado. Ambos, fueron digeridos con *XhoI* y *AscI*, se eliminó el ADN metilado correspondiente a los plásmidos molde con la enzima *DpnI* y finalmente se realizó una ligación con la ligasa del fago T4.

Los plásmidos generados de la ligación se transformaron en estirpes de *E. coli* DH5α y se seleccionaron 3 colonias (RSF3, RSF4 y RSF5) para confirmar la estructura de los

plásmidos. Se realizó un protocolo de aislamiento de ADN plasmídico y una posterior digestión con las enzimas *XhoI* y *AscI* para visualizar el mapa de restricción por electroforesis (Figura 5B). Se observan por separado el *oriR* (5548 pb) y el inserto con el MCS y el gen de resistencia a Km (1353 pb) al digerir con *XhoI* y con *AscI+XhoI*, mientras que la digestión con *AscI* linearizaba el plásmido (6795 pb). Finalmente, los plásmidos aislados fueron secuenciados mediante metodología Sanger por StabVida con el oligonucleótido 4 (Tabla 6). Los datos indican que RSF3 y RSF5 son clones (pSEVA25°1 V1) que tienen dos sitios de restricción para *XhoI* y otros dos para *AscI*, mientras que RSF4 (pSEVA25°1 V2) tiene un sólo sitio de corte para *XhoI* y otro para *AscI* (Figura 5C). Esto último no es consistente con su mapa de restricción.



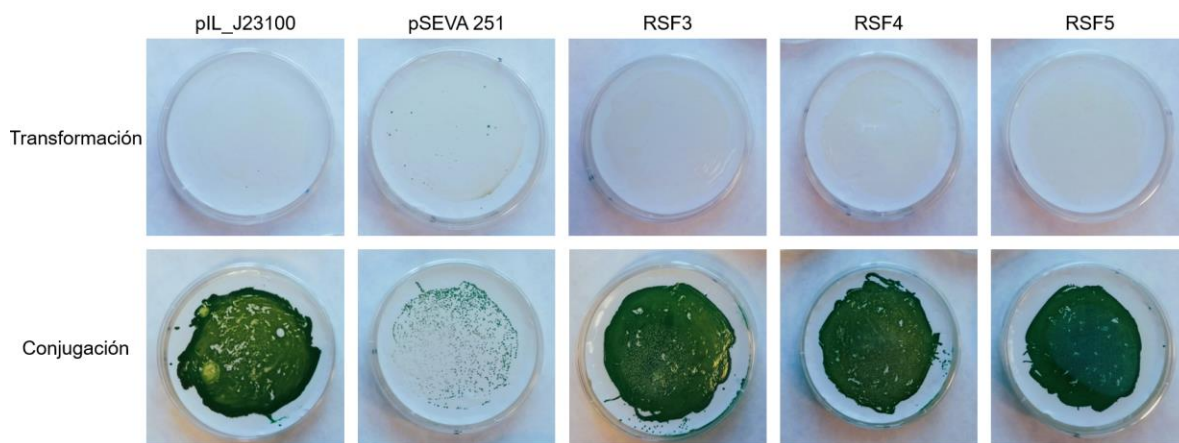
**Figura 5. Diseño y confirmación del nuevo plásmido sintético.** (A) Mapa genético del plásmido pSEVA 25°1 diseñado. El *oriV* y *oriT* RSF1010 (verde). El gen de resistencia al antibiótico (Km<sup>R</sup>) (azul) y el sitio de restricción múltiple (MCS) (morado), aislado por los terminadores T1 y T0 (rosas), están flanqueados por sitios de restricción *AscI* y *XhoI*. (B) Electroforesis en gel de agarosa de la selección de colonias transformadas con el pSEVA 25°1 (RSF3, 4 y 5) tras una digestión con *XhoI* y *AscI*. En las digestiones con *XhoI* y *XhoI+AscI* se localiza el *oriR* (5548 pb) y el inserto MCS+Km<sup>R</sup> (1353 pb). La digestión con *AscI* produjo una banda única (6795 pb). Esto fue igual en los tres clones. (C) Representación de la secuenciación de los dos pSEVA25°1 aislados. RSF3 y RSF5 (pSEVA25°1 V1) presentan un sitio de corte *XhoI* entre dos *AscI* y otro sitio *XhoI* más alejado. RSF4 (pSEVA25°1 V2) presenta un único sitio de corte *AscI* y otro *XhoI*.



#### 5.4. Transferencia de los nuevos plásmidos pSEVA 25°1 en *Synechocystis*

El nuevo plásmido pSEVA 25°1 posee un *oriT* propio, distinto del presente en los pSEVA (RP4), por lo que la eficiencia en la transferencia puede verse afectada. Además, el tamaño del plásmido sintético es 1,5 kb más grande que el pSEVA de referencia, lo que puede tener una implicación en el proceso. A fin de corroborar el efecto en la transferencia de estas variaciones en la estirpe de *Synechocystis* WT, se transformaron y conjugaron por separado los tres plásmidos pSEVA 25°1 previamente secuenciados (RSF3, RSF4 y RSF5), junto con el pSEVA 251 y el pIL\_J23100, para comparar su eficiencia de transferencia y replicación. Los elementos conjugativos presentes en estos plásmidos son distintos, pues el pSEVA 251 porta un *oriT* RP4, mientras que los plásmidos pIL\_J23100 y pSEVA25°1 (RSF3, 4 y 5) portan un *oriT* RSF1010 (Tabla 5).

Los cultivos crecieron en medio selectivo y se observó la aparición de colonias resistentes al antibiótico. Los resultados indican que hay una reducción en la eficiencia de la transformación de los pSEVA 25°1 y el pIL\_J23100, debido a la formación de un menor número de colonias, respecto al pSEVA 251 (Figura 6). Sin embargo, ocurrió lo contrario con la eficiencia de la conjugación, que fue significativamente mayor en todos los plásmidos con un *oriT* RSF1010 respecto al pSEVA 251. Las colonias crecidas se genotiparon mediante PCR con los oligonucleótidos 3 y 4 (Tabla 6) para confirmar la presencia de los plásmidos.



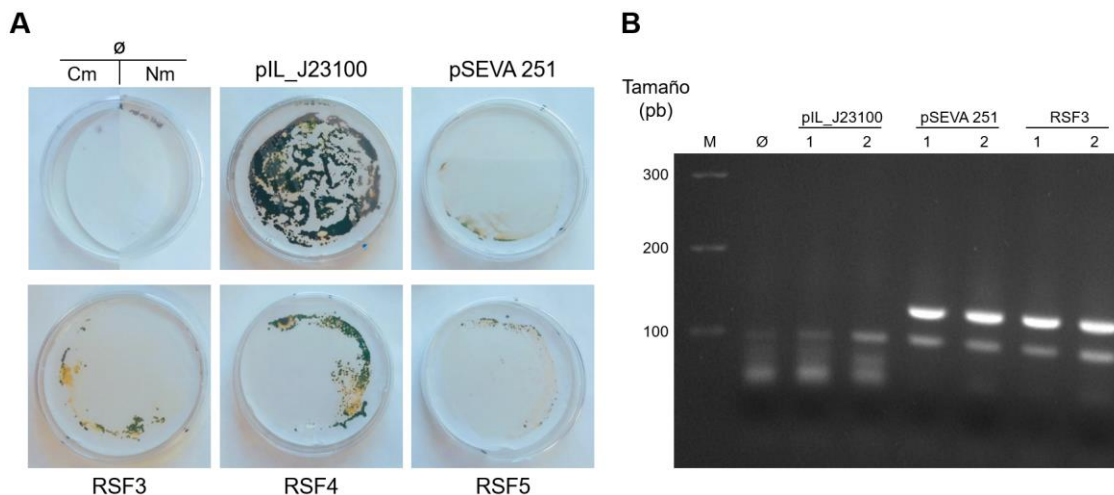
**Figura 6. Transformación y conjugación de los nuevos plásmidos pSEVA25°1 en *Synechocystis* WT.** Los cultivos sin vector no crecieron (imágenes no mostradas) en presencia de los antibióticos (Cm y Km). Los cultivos con pIL\_J23100 (Cm) y pSEVA 25°1 (RSF3, 4 y 5) (Km) crecieron con una eficiencia similar. En las transformaciones, el pSEVA 251 (Km) presentó un mayor número de colonias, mientras que la conjugación fue significativamente más eficiente en los plásmidos pIL\_J23100 y pSEVA 25°1 respecto al pSEVA 251.

## 5.5. Conjugación de los nuevos plásmidos pSEVA 25°1 en *Anabaena*

Uno de los objetivos de desarrollar plásmidos estandarizados con un amplio rango de huésped es su funcionalidad en diferentes organismos aplicando una metodología común. *Anabaena* no tiene la capacidad de ser transformada, a diferencia de *Synechocystis*, por lo que se realizó una conjugación triparental con los plásmidos utilizados en el experimento anterior para estudiar su viabilidad en la cianobacteria filamentosa.

Además de los elementos conjugativos, el *oriV* en estos plásmidos difiere, lo que puede alterar su capacidad replicativa. Los plásmidos pIL\_J23100 y pSEVA25°1 portan un *oriV* RSF1010 original, mientras que el pSEVA 251 porta un RSF1010 modificado (Tabla 5).

Los cultivos conjugados crecieron en medio selectivo con los antibióticos los cuáles presentan resistencia y se observó el crecimiento de colonias (Figura 7A). Debido a un fallo técnico, los plásmidos pSEVA 251 y pSEVA 25°1 (RSF3, 4 y 5) crecieron en presencia de Km y Cm durante la primera semana, cuando sólo presentaban resistencia al primero. Por ello, no se puede establecer una diferencia en la eficiencia de la conjugación al comparar el número de colonias. Todos los cultivos conjugados con plásmidos formaron colonias, que se confirmaron mediante PCR por duplicado con los oligonucleótidos 3 y 4 (Tabla 6), lo que confirma la capacidad replicativa del pSEVA 25°1 en *Anabaena* (Figura 7B).



**Figura 7. Conjugación de los nuevos plásmidos pSEVA25°1 en *Anabaena*.** (A) Crecimiento de colonias en medio BG11 con los antibióticos a los cuales presentan resistencia. Los cultivos sin vector (∅) no crecieron en presencia de los antibióticos utilizados (Cm y Nm) mientras que las estirpes con los plásmidos pIL\_J23100, pSEVA 251 y pSEVA25°1 (RSF3, 4 y 5) presentaron colonias. (B) Electroforesis confirmativa por duplicado de la PCR de colonias del MCS (135 pb) amplificado de los pSEVA 251 y 25°1 (RSF3). pIL\_J23100 no porta el MCS de los pSEVA por lo que no hubo amplificación. Esto fue representativo del resto de confirmaciones.

## **6. Discusión**

La biotecnología es uno de los campos con mayor crecimiento de las últimas décadas y las predicciones indican que superará los 20 billones de dólares americanos para 2030 (*Global Trends: The Future of Biotech*, 2021). Este desarrollo se le atribuye al suceso de bioconvergencia, lo que ha dado lugar a nuevos campos científicos como son la biología sintética y de sistemas.

Sin embargo, la ausencia de materiales y protocolos estandarizados en cianobacterias retrasan la construcción de los dispositivos genéticos necesarios para su modificación. Esto se ve reflejado por la falta de bibliografía que confirme la viabilidad de estas nuevas herramientas genéticas en distintos organismos modelos. El desarrollo de un plásmido de fácil uso y aplicación en diferentes grupos de cianobacterias podría acelerar los procesos de investigación y creación de nuevas aplicaciones biotecnológicas.

Los resultados aquí presentados, demuestran la eficiencia en la transferencia de una selección extensa de pSEVA por diferentes métodos: transformación, conjugación y electroporación. Sólo los plásmidos que portaban un *oriR* RSF1010 generaron colonias en medio selectivo (Figura 2A). Esto contradice lo publicado por Vasudevan et al. en 2019, donde obtuvieron por primera vez cultivos crecidos en medio selectivo conjugados con el pSEVA 421, cuyo *oriR* RK2 fue probado en este trabajo.

Tampoco aparecieron colonias en la estirpe de *Synechocystis pir*<sup>+</sup> transferida con el plásmido con un *oriR* R6K (Figura 3A). Tanto RK2 como R6K presentan un mismo mecanismo de replicación de tipo Theta (Solar et al., 1998), que podría no ser completamente funcional en *Synechocystis*. También podría indicar que la utilización de estos vectores y su capacidad replicativa en *Synechocystis* no está optimizada y los protocolos correspondientes no ofrecen resultados asegurados. Otra posibilidad es que se utilizaron condiciones desconocidas en otros trabajos que en este no se pudieron replicar.

Un factor importante que caracteriza a los pSEVA es su modularidad, que permite el fácil intercambio de elementos génicos. Esta fue verificada al transformar diferentes vectores con *oriR* RSF1010, cuya única diferencia fue el gen de resistencia. No se observaron diferencias significativas en el número de colonias crecidas, lo que es concluyente con Mermet-Bouvier et al., 1993.

De entre los métodos de transferencia realizados en este trabajo en *Synechocystis*, la electroporación fue el más eficiente con los plásmidos de la librería SEVA (Tabla 7). El mecanismo de transformación natural en *Synechocystis* se desconoce, pero se teoriza que el plásmido entra en la célula en forma de cadena única (Chauvat et al., 1986). Esto podría provocar una pérdida en el número de plásmidos finales integrados en una célula, respecto a la electroporación que se introduce directamente de forma circular. Sin embargo, la transformación es un método más sencillo y requiere de menos materiales, por lo que su utilización para la transferencia de los pSEVA sigue siendo recomendada.

**Tabla 7. Sistema de transferencia recomendado de los plásmidos viables en *Synechocystis* de este trabajo**

Plásmido	<i>OriV</i>	<i>OriT</i>	Ab <sup>R</sup>	Método recomendado
pSEVA 251	RSF1010 SEVA	RP4	Km	Transformación / Electroporación
pSEVA 351	RSF1010 SEVA	RP4	Cm	Transformación / Electroporación
pSEVA 451	RSF1010 SEVA	RP4	St/Sp	Transformación / Electroporación
pIL_J23100	RSF1010 original	RSF1010	Cm	Conjugación
pSEVA 25°1	RSF1010 original	RSF1010	Km	Conjugación

La conjugación fue el método más eficiente en la transferencia de los nuevos plásmidos sintéticos generados en este trabajo (pSEVA25°1 V1 y V2). Estos presentan diferentes sitios de corte para *XhoI* y *AscI*. Los resultados de la electroforesis del mapa de restricción del RSF4 (pSEVA25°1 V2) (Figura 3B) y de su secuenciación (Figura 3C) son contradictorios, ya que la digestión con *XhoI* separa el MCS+Km<sup>R</sup> del *oriR* (dos sitios de corte) en vez de linearizar el plásmido (un sólo sitio según la secuenciación). Sin embargo, se le otorga una mayor validez a la secuenciación ya que la metodología es más fidedigna.

Estos nuevos vectores con un *oriR* RSF1010 sin modificar presentaron una mejora significativa en la eficiencia de la conjugación respecto a los pSEVA, que presentan un *oriV* RSF1010 modificado y un *oriT* RP4 (Figura 6). Esto se puede atribuir a que el *oriT* RSF1010 es más eficiente en *Synechocystis* respecto al RP4. También podría significar que el *oriV* RSF1010 de los pSEVA se replica menos eficientemente que el RSF1010 original.

Numerosos grupos han modificado con resultados variados los vectores basados en el RSF1010. La diana más común es la represión de la proteína RepB, que aumenta el número de copias, pero afecta negativamente a la eficiencia de la conjugación (Bishé et al., 2019). Por lo tanto, en la optimización de los distintos *oriR* de los pSEVA, podrían haberse eliminado elementos relevantes en los procesos de replicación y transferencia plasmídica, lo que ha comprometido su viabilidad en *Synechocystis*.

## 6.1. Perspectivas futuras

Este trabajo remarca la necesidad del desarrollo de una plataforma de vectores de fácil uso y modificación que sea funcional en diversas estirpes de cianobacterias. Aquí, se detalla la falta de *oriR* eficientes entre los pSEVA para el organismo modelo *Synechocystis*. Los resultados negativos de los cultivos transferidos con el pSEVA con R6K podrían deberse a una baja expresión del gen *pir* en la estirpe de *Synechocystis pir*<sup>+</sup>. En experimentos futuros, deberá estudiarse su expresión y sustituir el promotor por uno que lo aumente.

Con el objetivo de mejorar la librería SEVA disponible, se diseñó un nuevo plásmido sintético que presentó una mejora significativa en la conjugación de *Synechocystis*. La diferencia en la eficiencia de la transformación y conjugación de los plásmidos pSEVA y el nuevo plásmido sintético aún no tiene una causalidad definida. Se ha demostrado que el gen de resistencia a antibiótico no afecta a la transferencia del plásmido, pero sería interesante determinar si es el cambio del *oriV* o del *oriT* en el nuevo plásmido, lo que provoca las diferencias respecto al pSEVA, o es un efecto combinado de ambos. Por ello, deberá construirse un plásmido sintético análogo al creado en este trabajo, pero con el *oriT* RP4 de los pSEVA. Consecuentemente, podría diseñarse otro plásmido con el *oriV* RSF1010 optimizado de los pSEVA y el *oriT* del RSF1010 original.

Otro de los propósitos de este trabajo fue probar la viabilidad de los nuevos plásmidos sintéticos en distintas estirpes de cianobacterias. Sin embargo, no se pudo determinar la eficiencia de la conjugación en *Anabaena* por fallos técnicos, por lo que se deberá repetir este experimento apropiadamente. Esto contribuiría en la búsqueda de un plásmido de amplio rango de huésped, con mejor eficiencia en la transferencia y con un mayor número de copias.

## 7. Referencias

- Aizat, W. M., Ismail, I., & Noor, N. M. (2018). Omics Applications for Systems Biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1102, 1–9. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-98758-3>
- Allaf, M. M., & Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 696, 10(4), 696. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10040696>
- Bensaude-Vincent, B. (2009). Biomimetic Chemistry and Synthetic Biology: A Two-way Traffic Across the Borders. In *HYLE-International Journal for Philosophy of Chemistry* (Vol. 15, Issue 1).
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154(3), 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)
- Birnboim, H. C. (1983). [17] A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100(C), 243–255. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)00059-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)00059-2)
- Bishé, B., Taton, A., & Golden, J. W. (2019). Modification of RSF1010-Based Broad-Host-Range Plasmids for Improved Conjugation and Cyanobacterial Bioprospecting. *IScience*, 20, 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.002>
- Cadoret, F., Soscia, C., & Voulhoux, R. (2014). Gene transfer: Transformation/electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 11–15. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_2/TABLES/1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_2/TABLES/1)
- Camsund, D., Heidorn, T., & Lindblad, P. (2014). Design and analysis of LacI-repressed promoters and DNA-looping in a cyanobacterium. *Journal of Biological Engineering*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-4>
- Carlson, R. (2009). The changing economics of DNA synthesis. *Nature Biotechnology* 2009 27:12, 27(12), 1091–1094. <https://doi.org/10.1038/nbt1209-1091>
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A., & Van Arkel, G. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *204*, 185–191.
- Chen, Y., Taton, A., Go, M., London, R. E., Pieper, L. M., Golden, S. S., & Golden, J. W. (2016). Self-replicating shuttle vectors based on pANS, a small endogenous plasmid of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(12), 2029–2041. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.000377/CITE/REFWORKS>
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 1970 227:5258, 227(5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Elhai, J., & Wolk, C. P. (1988). [83] Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167(C), 747–754. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67086-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67086-8)
- Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden Gate cloning. *Methods in Molecular Biology*, 1116, 119–131. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8\\_9/FIGURES/3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9/FIGURES/3)
- Fernández López, C. (2015). *Relaxasas conjugativas de la familia Mob V*.
- Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2016). *Evolution of Oxygenic Photosynthesis*. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-060313-054810>
- Galdzicki, M., Clancy, K. P., Oberortner, E., Pocock, M., Quinn, J. Y., Rodriguez, C. A., Roehner, N., Wilson, M. L., Adam, L., Anderson, J. C., Bartley, B. A., Beal, J., Chandran, D., Chen, J., Densmore, D., Endy, D., Grünberg, R., Hallinan, J., Hillson, N. J., ... Sauro, H. M. (2014). The Synthetic Biology Open Language (SBOL) provides a community standard for communicating designs in synthetic biology. In *Nature Biotechnology* (Vol. 32, Issue 6, pp. 545–550). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt.2891>
- García-Domínguez, M., Lopez-Maury, L., Florencio, F. J., & Reyes, J. C. (2000). A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1507–1514. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1507-1514.2000>
- García-Fernández, J. M., de Marsac, N. T., & Diez, J. (2004). Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 68(4), 630–638. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.630-638.2004>
- Glass, J. I., Merryman, C., Wise, K. S., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2017). Minimal Cells—Real and Imagined. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(12). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A023861>
- Global Trends: The Future of Biotech*. (2021).
- Ikeuchi, M., & Satoshi Tabata, &. (2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803—a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. In *Photosynthesis Research* (Vol. 70).
- Jin, H., Wang, Y., Idoine, A., & Bhaya, D. (2018). Construction of a shuttle vector using an endogenous plasmid from the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC6803. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 345780. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01662/BIBTEX>
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Yamada, M., & Tabata, S. (2003). Structural Analysis of Four Large Plasmids Harboring in a Unicellular Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, 10(5), 221–228. <https://doi.org/10.1093/DNARES/10.5.221>
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., ... Tabata, S. (2001). Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205–213. <https://doi.org/10.1093/DNARES/8.5.205>

- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., ... Tabata, S. (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 Research*, 3(3), 109–136. <https://doi.org/10.1093/DNARES/3.3.109>
- Karp, P. D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C. A., Latendresse, M., Kothari, A., Keseler, I. M., Krummenacker, M., Midford, P. E., Ong, Q., Ong, W. K., Paley, S. M., & Subhraveti, P. (2019). *The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways*. 20(4), 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Kolter, R., Inuzuka, M., & Helinski, D. R. (1978). Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell*, 15(4), 1199–1208. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90046-6)
- Kües, U., & Stahl, U. (1989). Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews*, 53(4), 491. <https://doi.org/10.1128/MR.53.4.491-516.1989>
- Lee, T. S., Krupa, R. A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W. J., Prasad, N., Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2011). BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression. *Journal of Biological Engineering*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-5-12/TABLES/2>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., & Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from Microalgae. *Biotechnology Progress*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.1021/BP070371K>
- Lindblad, P., Fuente, D., Borbe, F., Cicchi, B., Conejero, J. A., Couto, N., Čelešnik, H., Diano, M. M., Dolinar, M., Esposito, S., Evans, C., Ferreira, E. A., Keller, J., Khanna, N., Kind, G., Landels, A., Lemus, L., Noirel, J., Ocklenburg, S., ... Wünschiers, R. (2019). CyanoFactory, a European consortium to develop technologies needed to advance cyanobacteria as chassis for production of chemicals and fuels. In *Algal Research* (Vol. 41). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101510>
- Ludwig, A., Heimbucher, T., Gregor, W., Czerny, T., & Schmetterer, G. (2008). Transformation and gene replacement in the facultatively chemoheterotrophic, unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714 by electroporation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 729–735. <https://doi.org/10.1007/S00253-008-1356-Y/FIGURES/3>
- Lyras, D., & Rood, J. I. (1998). Conjugative transfer of RP4-oriT shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium perfringens*. *Plasmid*, 39(2), 160–164. <https://doi.org/10.1006/PLAS.1997.1325>
- Mager, M., Pineda Hernandez, H., Brandenburg, F., López-Maury, L., McCormick, A. J., Nürnberg, D. J., Orthwein, T., Russo, D. A., Victoria, A. J., Wang, X., Zedler, J. A. Z., Branco dos Santos, F., & Schmelling, N. M. (2023). Interlaboratory Reproducibility in Growth and Reporter Expression in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synthetic Biology*, 12, 1823–1835. [https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.3C00150/ASSET/IMAGES/LARGE/SB3C00150\\_0005.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.3C00150/ASSET/IMAGES/LARGE/SB3C00150_0005.JPEG)
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., & Chauvat, F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Molecular Biology*, 23(4), 905–909. <https://doi.org/10.1007/BF00021546/METRICS>
- Mermet-Bouvier, P., Cassier-Chauvat, C., Marraccini, P., & Chauvat, F. (1993). Transfer and Replication of RSF1010-Derived Plasmids in Several Cyanobacteria of the Genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. In *CURRENT MICROBIOLOGY* (Vol. 27).
- Monod, J., & Jacob, F. (1961). Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26, 389–401. <https://doi.org/10.1101/SQB.1961.026.01.048>
- Muro-Pastor, A. M., & Hess, W. R. (2012). Heterocyst differentiation: From single mutants to global approaches. *Trends in Microbiology*, 20(11), 548–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.07.005>
- Oeser, S., Wallner, T., Schuergers, N., Bučinská, L., Sivabalasarma, S., Bähre, H., Albers, S. V., & Wilde, A. (2021). Minor pilins are involved in motility and natural competence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, 116(3), 743–765. <https://doi.org/10.1111/MMI.14768>
- Pansegrau, W., Balzer, D., Kruff, V., Lurz, R., & Lanka, E. (1990). In vitro assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6555–6559. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.17.6555>
- Porter, R. D. (1986). Transformation in cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(2), 111–132. <https://doi.org/10.3109/10408418609108736/ASSET/CMS/ASSET/6BA8019D-759B-4077-8B77-62D288D4C72A/10408418609108736.FP.PNG>
- Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. M., & Bhattacharya, D. (2007). The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Genet.41.110306.130134>, 41, 147–168. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.41.110306.130134>
- Rippka, R. (1972). Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. *Archiv Für Mikrobiologie*, 87(1), 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF00424781/METRICS>
- Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, N. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1–61.
- Sambrook, J., F. E. R., & M. T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Scherzinger, E., Bagdasarian, M. M., Scholz, P., Lurz, R., & Rückert, B. (1984). Replication of the broad host range plasmid RSF1010: requirement for three plasmid-encoded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 654. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.3.654>
- Sengupta, A., Pakrasi, H. B., & Wangikar, P. P. (2018). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 13, pp. 5457–5471). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9046-x>
- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, *2*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5/TABLES/4>
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & Cruz, F. de la. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, *74*(3), 434. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Smolke, C. D. (2009). Building outside of the box: iGEM and the BioBricks Foundation. *Nature Biotechnology* *2009* *27*:12, *27*(12), 1099–1102. <https://doi.org/10.1038/nbt1209-1099>
- Solar, G. Del, Giraldo, R., María, J. R.-E., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(2), 434–464. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998>
- Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (2003). Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.001301>, *31*, 225–274. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.31.100177.001301>
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). In *BACTEROLOGICAL REVIEWS*.
- Taton, A., Unglaub, F., Wright, N. E., Zeng, W. Y., Paz-Yepes, J., Brahamsha, B., Palenik, B., Peterson, T. C., Haerizadeh, F., Golden, S. S., & Golden, J. W. (2014). Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Research*, *42*(17), 136. <https://doi.org/10.1093/nar/gku673>
- Thiel, T., & Peter Wolk, C. (1987). [13] Conjugal transfer of plasmids to cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, *153*(C), 232–243. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53056-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53056-7)
- Thiel, T., & Poo, H. (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *Journal of Bacteriology*, *171*(10), 5743. <https://doi.org/10.1128/JB.171.10.5743-5746.1989>
- Vasudevan, R., Gale, G. A. R., Schiavon, A. A., Puzorjov, A., Malin, J., Gillespie, M. D., Vavitsas, K., Zulkower, V., Wang, B., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & McCormick, A. J. (2019). Cyanogate: A modular cloning suite for engineering cyanobacteria based on the plant mocl syntax. *Plant Physiology*, *180*(1), 39–55. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01401>
- Vermaas, W. (1996). Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 8). Kluwer Academic Publishers.
- Vioque, A. (2007). Transgenic Microalgae as Green Cell Factories: Transformation of Cyanobacteria. In R. León, A. Galván, & E. Fernández (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 616, pp. 12–22). Springer. <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>;
- Wang, F., Gao, Y., & Yang, G. (2020). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria for improved chemicals production. In *Bioengineered* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1208–1220). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1837458>
- Williams, J. G. K. (1988). Construction of Specific Mutations in Photosystem II Photosynthetic Reaction Center by Genetic Engineering Methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology*, *167*(C), 766–778. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67088-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67088-1)
- Yagi, Y., & Shiina, T. (2014). Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. *Frontiers in Plant Science*, *5*(FEB). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00061>
- Yéprémian, C., Catherine, A., Bernard, C., Congestri, R., Elersek, T., & Pilkaityte, R. (2016). Chlorophyll a Extraction and Determination. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 331–334. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.CH34>
- York, D., Ivanov, V., Gan, J., & Filutowicz, M. (1992). Translational options for the *pir* gene of plasmid R6K: multiple forms of the replication initiator protein  $\pi$ . *Gene*, *116*(1), 7–12. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90622-V](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90622-V)
- Yoshida, N., & Sato, M. (2009). Plasmid uptake by bacteria: A comparison of methods and efficiencies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *83*(5), 791–798. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2042-4/FIGURES/1>
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. *Environments* *2020*, *Vol. 7*, *Page 13*, *7*(2), 13. <https://doi.org/10.3390/ENVIRONMENTS7020013>